

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Jakub Červenka

Studium stresu v endoplazmatickém retikulu

Endoplasmic reticulum stress

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. srpna 2012

Poděkování

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivé vedení, laskavý přístup a cenné rady, bez kterých by tato práce nevznikla.

Dále děkuji doc. RNDr. Fatimě Cvrčkové, Dr. za rady při vytváření a vyhodnocování analýzy podobnosti primární struktury proteinů. Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. děkuji za konzultaci v oblasti problematiky UVB záření.

Za jazykové korektury celé práce děkuji své snoubence Ivaně Řehákové a svému bratrovi Mgr. Janu Červenkovi. Za korektury anglického abstraktu patří díky mé kamarádce Aleně Kříčkové.

Celé své rodině a přátelům pak za podporu a pochopení při vytváření této bakalářské práce.

Obsah

Seznam užitých zkratek.....	4
Abstrakt.....	8
1. Úvod.....	9
2. Endoplazmatické retikulum.....	11
2.1 Původ endoplazmatického retikula.....	11
2.2 Jaderný obal.....	11
2.3 Drsné endoplazmatické retikulum.....	13
2.4 Hladké endoplazmatické retikulum.....	17
3. Stres v endoplazmatickém retikulu.....	21
3.1 Vznik stresu v endoplazmatickém retikulu.....	21
3.2 Buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.3 Buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) u savců.....	33
3.4 Metody studia stresu v endoplazmatickém retikulu u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...36	
4. Závěr.....	38
5. Seznam užití literatury.....	39

Seznam užítých zkratk

3'/5' ss	3'/5' splicing site	3'/5' místo sestřihu
7S RNA	small cytoplasmic RNA with sedimentation coefficient of 7 Svedberg	malá cytoplazmatická RNA se sedimentačním koeficientem 7 Svedbergů
A, C, G, T, U	adenosine, cytidine, guanosine, thymidine, uridine	adenosin, cytidin, guanosin, thymidin, uridin
ADP/ATP	adenosine di/triphosphate	adenosindifosfát, adenosintrifosfát
angl.	in English	anglicky
<i>ATF4</i>	activating transcription factor 4 gene	gen kódující aktivační transkripční faktor 4
<i>Atf4/6</i>	activating transcription factor 4/6	aktivační transkripční faktor 4/6
AUG	start codon	iniciační kodon
Bap31	B-cell receptor-associated protein 31	protein spojený s receptorem B-buněk 31
Bax	BCL2-associated X protein	protein spojený s proteinovou rodinou Bcl2
Bi-1	Bax inhibitor 1	inhibitor proteinu Bax 1
BiP	binding immunoglobulin protein	protein vázající imunoglobulin
BLAST	basic local alignment search tool	algoritmus pro porovnání podobností v sekvencích nukleových kyselin a proteinů
<i>BXII</i>	Bax inhibitor 1 gene	gen kódující inhibitor proteinu Bax 1
Bxi1	Bax inhibitor 1	inhibitor proteinu Bax 1
Cdc2+	cell division cycle 2+ protein	protein buněčného cyklu 2+
Cdc28	cell division cycle 28 protein	protein buněčného cyklu 28
cDNA	complementary DNA	DNA komplementární k mRNA
Chop	C/EBP-homologous protein	protein homologní s C/EBP
Climp63	cytoskeleton-linking membrane protein of 63 kDa	membránový protein spojující cytoskelet o molekulové hmotnosti 63 000 Daltonů
CPA	core promoter activation	základní promotorová aktivace
<i>DCR2</i>	dose-dependent cell cycle regulator 2 gene	gen kódující regulátor buněčného cyklu závislý na množství 2
Dcr2	dose-dependent cell cycle regulator 2	regulátor buněčného cyklu závislý na množství 2
<i>DER1</i>	degradation in the ER 1 gene	gen kódující protein pro degradaci v ER 1
Der1/Derlin-1	degradation in the ER 1 protein	protein pro degradaci v ER 1
DiOC₆	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide	3,3'-dihexyloxacarbocyanin iodid
DLKP(Q/E)N	aspartic acid, leucine, lysine, proline, (glutamine/glutamic acid), arginine	kyselina asparagová, leucin, lysin, prolin, (glutamin/kyselina glutamová), arginin
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
eIF2α	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	eukaryotní iniciační faktor 2 α
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERAD	ER-associated degradation	degradace proteinů z ER
Erdj3	mammalian ER DnaJ 3 protein	savčí protein DnaJ 3 v ER

ERES	ER exit site	doména hladkého ER, odkud pučí váčky směřující ke Golgiho aparátu
ERMES	ER-mitochondria encounter structure	doména periferního ER u kvasinky <i>S. cerevisiae</i> analogická MAM
<i>ERN1</i>	ER-to-nucleus signaling 1 gene	gen pro protein signalizující z ER do jádra 1
Ern1	ER-to-nucleus signaling 1 protein	protein signalizující z ER do jádra 1
<i>ERO1</i>	ER oxidation 1 gene	gen kódující protein pro oxidaci v ER 1
Ero1	ER oxidation 1 protein	protein pro oxidaci v ER 1
ERQC	ER quality control compartment	doména hladkého ER, kde jsou z ER odstraňovány nesprávně sbalené proteiny
ERSE	ER stress response element	element aktivní při stresu v ER
<i>ERV29</i>	ER vesicle 29 gene	gen kódující protein pro vezikuly z ER 29
<i>EUG1</i>	ER protein unnecessary for growth 1 gene	gen kódující protein ER neesenciální pro buněčný růst
<i>FKB2</i>	FKBP proline rotamase 2 gene	gen pro peptidyl-prolyl cis-trans izomerázu 2
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
<i>HAC1</i>	homologous to Atf/Creb 1 gene	gen pro protein homologní s Atf/Creb 1
Hac1/A	homologous to Atf/Creb 1/A protein	protein homologní s Atf/Creb 1/A
HDEL	histidine, aspartic acid, glutamic acid, leucine	histidin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, leucin
HLE	helix loop element	element s topologií šroubovice a smyčky
HP21	experimentally used substrate for Ire1	experimentálně užívaný substrát pro Ire1
HPL	hyper-phosphorylated loop	vysoce fosforylovaná smyčka
Hrd1/3	HMG-coA reductase degradation 1/3	proteiny zapojené v ERAD
Hsp70	heat shock protein 70	protein teplotního šoku 70
<i>INO1</i>	inositol requiring 1 gene	gen kódující protein metabolismu inositolu 1
Ino2/4	inositol requiring 2/4 protein	protein metabolismu inositolu 2/4
IP₃	inositol 1,4,5-triphosphate	inositol-1,4,5-trifosfát
<i>IRE1</i>	inositol requiring 1 gene	gen, jehož delece vede k auxotrofii na inositol
Ire1α/β-1	inositol requiring 1 type α/β -1 protein	protein klíčový pro UPR, typ α/β -1
K	kinase domain	kinázová doména
<i>KAR2</i>	karyogamy 2 gene	gen kódující protein pro karyogamii 2
Kar2	karyogamy 2 protein	protein pro karyogamii 2
Kap60/95	karyopherin 60/95 protein	protein karyoferin 60/95
kDa	1 000 Daltons	1 000 Daltonů
KKKRKR	lysine, lysine, lysine, arginine, lysine, arginine	lysin, lysin, lysin, arginin, lysin, arginin
lac-Z	gene for β -galactosidase	gen kódující β -galaktosidázu
<i>LHS1</i>	luminal Hsp seventy 1 gene	gen pro protein Hsp70 lumen ER 1
MAM	mitochondria associated membrane	doména hladkého ER, která je v kontaktu s mitochondrii

Mdm10/12/34	mitochondrial distribution and morphology 10/12/34 protein	protein regulující lokalizaci a morfologii mitochondrií 10/12/34
MDM12	mitochondrial distribution and morphology 12 gene	gen kódující protein regulující lokalizaci a morfologii mitochondrií 12
MET25	methionine requiring 25 gene	gen pro protein metabolismu methioninu 25
Mmm1	maintenance of mitochondrial morphology 1 protein	protein udržující morfologii mitochondrií 1
mRNA	messenger RNA	informační RNA
MSI-H nádory	tumors with microsatellite instability in high frequency	nádory s vysokou frekvencí nestability mikrosatelitů
MTB-1 doména	microtubules binding 1 domain	doména vázající mikrotubuly 1
např.	for example	například
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
NE	nuclear envelope	jaderný obal
Nesprin-1/-2	nuclear envelope spectrin repeat protein	protein jaderného obalu obsahující spektrínová opakování
NLS	nuclear localization sequence	sekvence cílící do jádra
NPC	nuclear pore complex	komplex jaderného póru
Obr.	a figure	obrázek
OPI1	overproducer of inositol 1 gene	gen pro regulátor metabolismu inositolu
Opi1	overproducer of inositol 1 protein	negativní regulátor metabolismu inositolu
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
OST1	oligosaccharyltransferase 1 gene	gen kódující oligosacharid transferázu 1
P	phosphate residue	fosfátový zbytek
p180	protein having a molecular mass of 180 kDa	protein o molekulové hmotnosti 180 000 Daltonů
PAM	plasma membrane-associated membrane	doména hladkého ER, která je v kontaktu s cytoplazmatickou membránou
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PDI1	protein disulfide isomerase 1 gene	gen pro protein disulfid izomerázu 1
PERK	PKR-like ER kinase gene	gen kódující kinázu ER podobnou PKR
Perk	PKR-like ER kinase	kináza ER podobná PKR
pKT007	plasmid KT007	plazmid KT007
polyA	poly(A) tail	poly-A konec
Pom proteiny	pore membrane proteins	proteiny membránového póru
Pp2c	protein phosphatase type 2c	protein fosfatáza typu 2c
PSI-BLAST	position-specific iterated BLAST	pozičně specifický iterovaný BLAST
PTC1/2	phosphatase type two C 1/2 gene	gen kódující fosfatázu typu 2C 1/2
Ptc2	phosphatase type two C 2	fosfatáza typu 2C 2
R	RNase domain	Rnázová doména
Ran	Ras-related nuclear protein	jaderný protein z proteinové rodiny Ras
Rlg1	tRNA ligase 1	tRNA ligáza 1

RNA	ribonucleic acid	kyselina ribonukleová
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
Rtn1/2	reticulon 1/2 protein	protein retikulon 1/2
RT-PCR	reverse transcription PCR	reverzní transkripce spojená s PCR
ss	signal sequence	signální sekvence
S1P, S2P	site-1 protease, site-2 protease	specifická proteáza 1/2
<i>SAC1</i>	suppressor of actin 1 gene	gen kódující supresor aktinu 1
Sbh1	Sec61 beta homolog 1 protein	protein 1 homologický se Sec61β
<i>SCJ1</i>	<i>S. cerevisiae</i> DnaJ 1 gene	gen pro protein DnaJ 1 <i>S. cerevisiae</i>
<i>SEC27/53/61/63/65/72</i>	secretory 27/61/63/65/72 gene	gen kódující protein sekreční dráhy 27/61/63/65/72
Sec61α/β/γ	secretory 61 subunit α/β/γ protein	protein sekreční dráhy 61 podjednotka α/β/γ
Sec62/63/66/71/72/Y	secretory 62/63/66/71/72/Y protein	protein sekreční dráhy 62/63/66/71/72/Y
Sey1	synthetic enhancer of Yop1 1 protein	protein zvyšující vliv proteinu Yop1 1
Sin4	switch independent 4 protein	protein nezávislý na aktivaci 4
Spt20	suppressor of Ty 20	supresor Ty 20
SRP	signal recognition particle	signál rozpoznávající částice
<i>SRP54/101/102</i>	signal recognition particle 54/101/102 gene	gen kódující protein signál rozpoznávající částice 54/101/102
Sss1	sec sixty-one suppressor protein	supresor Sec61
Sun1	<i>S. pombe</i> sad1/ <i>Ce</i> -UNC-84 domain containing 1 protein	protein obsahující doménu <i>S. pombe</i> sad1/ <i>Ce</i> -UNC-84
SV40	simian virus 40	opičí virus 40
tPhe	tRNA for phenylalanine	tRNA pro fenylalanin
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
tzv.	so-called	takzvané
U1A	U1 spliceosomal RNA A protein	protein A asociovaný s U1 RNA spliceozomu
UDP	uridine diphosphate	uridindifosfát
UGA	stop codon	terminační kodon
UPR	unfolded protein response	buněčná odpověď na nesbalené proteiny
UPRE	UPR element	UPR element
<i>URA3</i>	uracil requiring 3 gene	gen pro protein metabolismu uracilu 3
URL	uniform resource locator	jednoznačné určení zdroje
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
UVB	ultraviolet B	ultrafialové záření typu B
<i>XBPI</i>	X-box binding protein 1 gene	gen kódující protein vázající X-box 1
Xbp1	X-box binding protein 1	protein vážící X-box 1
X-Gal	analog of lactose	analog laktózy
<i>YDJ1</i>	yeast DnaJ 1 gene	gen kódující kvasinkový protein DnaJ 1
Yop1	YIP One partner 1 protein	protein 1 interagující s YIP1
z angl.	from English words	z anglického označení

Abstrakt

Akumulace nesbalených nebo nesprávně sbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu (ER) vede ke stresu v ER a k aktivaci buněčné odpovědi na nesbalené proteiny (UPR). Studie z posledních let ukazují, že stres v ER, respektive UPR, jsou spojeny s mnoha onemocněními, jako jsou například cukrovka, žloutenka typu C, prionová onemocnění, různé typy nádorů, Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova choroba, ale také s fyziologickými procesy, jako je diferenciací různých buněčných typů. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* při UPR dojde k oligomerizaci, transautofosforylaci a aktivaci proteinu Ire1, který vystřihuje intron z *HAC1* mRNA. Sestřižená forma proteinu Hac1 je transkripční faktor, který spouští transkripci genů pro chaperony ER, proteiny ERAD, syntézy lipidů a další proteiny, jejímž cílem je obnovit homeostázi v ER. U savců je UPR komplexnější a kromě evolučně dobře konzervované Ire1 dependentní dráhy zahrnuje ještě dráhy závislé na proteinech Perk a Atf6, které u kvasinek nejsou. Přesto přinejmenším protein Perk je aktivován a regulován podobně jako Ire1 u *S. cerevisiae*. S ohledem na široké spektrum metod pro genetickou manipulaci, rychlý růst a dobrou anotaci genomu je kvasinka *S. cerevisiae* vhodná jako modelový organismus pro studium základních mechanismů UPR u savců.

Klíčová slova: endoplazmatické retikulum, ER, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, funkce ER, stres v ER, buněčná odpověď na nesbalené proteiny, UPR, nemoci spojené s ER

Abstract

The accumulation of unfolded or misfolded proteins in endoplasmic reticulum (ER) leads to ER stress and the activation of unfolded protein response (UPR). Recent studies show that ER stress or UPR are associated with many diseases such as diabetes, hepatitis type C, prion disease, different kinds of tumors or Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease and also with physiological processes like cell differentiation. When UPR is activated in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Ire1 protein oligomerizes, transautophosphorylates and activates itself. After this, Ire1 cleaves *HAC1* mRNA to remove an intron. The spliced form of *HAC1* mRNA is translated into the Hac1 transcription factor, which induces transcription of genes for chaperones of lumen ER, proteins involved in ERAD, synthesis of lipids etc. The cell uses this to reestablish homeostasis in ER. In mammals, the UPR is more complex and except Ire1 dependent pathway, it comprises Perk and Atf6 pathways, which are missing in yeast. Nevertheless, Perk is activated and regulated by the similar mechanism as Ire1 in *S. cerevisiae*. In consideration of broad spectrum of methods for genetic manipulation, rapid growth and well annotated genome, the yeast *S. cerevisiae* is a useful model for study of general mechanisms of UPR in mammals.

Key words: endoplasmic reticulum, ER, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, ER function, ER stress, unfolded protein response, UPR, ER diseases

1. Úvod

Cílem práce je shrnout dosavadní poznatky o stresu v endoplazmatickém retikulu (ER) a buněčné odpovědi na nesbalené proteiny (UPR, z angl. unfolded protein response) u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a srovnat je s poznatky o stresu v ER a o UPR u savců.

Endoplazmatické retikulum je největší organelou ve většině eukaryotických buněk (Lynes a Simmen, 2011). Bylo poprvé popsáno na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu v roce 1944 a existence ER v živých buňkách byla poté potvrzena pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem (Porter et al., 1945; Porter a Kallman, 1952). Morfologicky i funkčně lze ER rozdělit do několika domén – na jaderný obal a periferní endoplazmatické retikulum. Periferní endoplazmatické retikulum můžeme morfologicky dále rozdělit na cisterny a tubuly, funkčně pak na drsné (na něj nasedají ribozomy) a hladké ER (bez ribozomů). Poměr jednotlivých částí ER se liší v závislosti na typu buňky. U kvasinek je periferní ER lokalizováno v blízkosti cytoplazmatické membrány, u vyšších eukaryot je pak rozprostřeno v celé cytoplazmě (Shibata et al., 2006).

V první části práce (kapitoly 2.1 až 2.4) jsou uvedeny základní informace o morfologii, lokalizaci a funkci ER v buňkách (kvasinek, živočišných i rostlinných), protože z velikosti, tvaru a lokalizace ER lze usuzovat na fyziologický stav buněk (Terasaki et al., 1998; Travers et al., 2000, Schuck et al., 2009).

V posledních letech stoupá počet studií zabývajících se stresem v ER (v roce 2000 bylo publikováno 158 článků v časopisech s impakt faktorem, v roce 2011 jich bylo již 1 878) a UPR (v roce 2000 bylo publikováno 30 článků v časopisech s impakt faktorem, v roce 2011 jich bylo již 314; data podle Web of Knowledge, dostupné z URL: www.webofknowledge.com).

Jedním z důvodů narůstajícího zájmu je, že proteiny ER jsou spojeny s řadou onemocnění u savců (včetně člověka), jako jsou např. spinální muskulární atrofie typu 1, 2 a 3, Limb-Girdlova muskulární dystrofie 1A a 1B, kongenitální muskulární dystrofie 1B, autozomálně dominantní polycystické postižení jater či MSI-H nádory (z angl. microsatellite instability in high frequency) žaludku, střev a konečníku (Mori et al., 2001; Mori et al., 2002; Schirmer et al., 2003; Davila et al., 2004).

Také stres v ER, potažmo UPR jsou spojeny s mnoha závažnými onemocněními savců, jako jsou např. cukrovka, jaterní cirhóza, virová hepatitida typu C, Alzheimerova a Parkinsonova choroba, prionová onemocnění, Huntingtonova a Kennedyho choroba, syndrom fragilního chromozomu X a mnoho typů rakoviny – například glioblastom či děložní adenokarcinom (Benali-Furet et al., 2005; Lu et al., 2009; onemocnění spojená s nervovou soustavou jsou shrnuta v Yang a Paschen, 2009; Lloyd et al., 2010; Bifulco et al., 2012). V posledních letech se navíc ukazuje, že stres v ER, respektive UPR se účastní přirozených vývojových procesů, jako je diferenciace B lymfocytů či buněk oční čočky (Gass et al., 2002; Firtina a Duncan, 2011). Více je uvedeno v kapitole 3.1.

Kapitola 3.2 se zabývá fenoménem UPR u kvasinky *S. cerevisiae* a v kapitole 3.3 je stručně shrnutí UPR u savců, sloužící ke srovnání těchto procesů v evolučně odlišných typech organismů. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* nebyla zvolena náhodou. Prvním důvodem je, že se jedná o jeden

z nejvíce používaných a nejlépe prozkoumaných modelových organismů eukaryotního typu. Druhým důvodem je, že výsledky získané v rámci této literární rešerše by měly posloužit k lepšímu pochopení organismu, kterým se chci dále zabývat i ve své diplomové práci.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (také známá jako pekařská kvasinka) je již řadu let využívána jako eukaryotní modelový organismus v molekulární biologii, genetice a buněčné fyziologii. K tomu ji předurčuje řada faktorů, jako jsou například jednobuněčnost, rychlý růst a levná kultivace do vysokých denzit. Z genetického hlediska pak možnost haploidní i diploidní formy, a tím tedy sexuální i asexuální množení (pučení). Díky jejímu mnohaletému využívání ve výzkumu jsou dostupné dobře popsání a zavedené molekulární techniky a nástroje pro její genetickou manipulaci. Lze provést transformaci buněk a indukovat expresi genu z epizomálního plazmidu či zajistit integraci genu do specifického místa na chromozomu, stejně tak jako inserci, delecii či mutaci jakékoliv sekvence v genomu (Petranovic et al., 2010).

Velký průlom znamenalo dokončení sekvenace jejího genomu a jeho následná publikace v roce 1996. Šlo o první plně osekvenovaný genom takového rozsahu a rovněž o první plně osekvenovaný eukaryotní genom. Bylo identifikováno celkem 6 275 otevřených čtecích rámců (ORF, z angl. open reading frame) a celková velikost genomu byla stanovena na 13 389 000 párů bází (Goffeau et al., 1996). V současné době byly údaje zpřesněny na 6 575 ORF (z toho 4 953 jich bylo ověřeno), a také celková velikost genomu byla upřesněna na 12 071 326 bp (podle *Saccharomyces* Genome Database, dostupné z URL: <http://www.yeastgenome.org/>, ke dni 28. 7. 2012). Je třeba zmínit, že není započtena mimojaderná DNA (mitochondriální a R plasmidová).

Více než 30 % kvasinkových genů, u kterých se předpokládá, že kódují protein, vykazuje statisticky významnou homologii s geny vyšších eukaryot, jako jsou myš, krysa, ovce, kráva či člověk (Botstein et al., 1997). Nedávný výzkum porovnával proteom kvasinky *S. cerevisiae* se známými sekvencemi 704 různých druhů organismů – 48 druhů archaea, 598 druhů bakterií a 59 druhů eukaryot. Nebyl nalezen jediný protein *S. cerevisiae*, který by měl homologii u všech druhů prokaryot. U eukaryot je samozřejmě mnoho vysoce konzervovaných proteinů zapojených do procesů, jako je např. transkripce, modifikace proteinů či organizace cytoskeletu. Oproti tomu buněčný cyklus či tvorba buněčné stěny u *S. cerevisiae* (respektive *Saccharomycet*, či hub obecně) zahrnují unikátní proteiny, které v rámci eukaryot nemají obdobu. Vzhledem k velkému počtu shodných proteinových sekvencí a podobně probíhajících biologických procesů (např. replikace DNA, ribozomální dráha, ubiquitinem řízená proteolýza či proteazomová dráha) se kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* ukázala jako vhodný modelový organismus pro studium těchto procesů a drah u savců včetně člověka (Karathia et al., 2011).

V Závěru (kapitola 4.) je shrnutí nejdůležitějších informací týkajících se stresu v ER, respektive UPR u kvasinky *S. cerevisiae* a savců se zdůrazněním možných využití kvasinky jako modelového organismu pro studium UPR u savců a zároveň omezení vyplývající z rozdílných drah UPR mezi kvasinkou a savci.

2. Endoplazmatické retikulum

2.1 Původ endoplazmatického retikula

Evoluční původ ER, ostatně jako vznik celého buněčného membránového transportního systému, zahrnujícího kromě ER také Golgiho aparát a četné endozomy, není ani dnes zcela jasný. Obecně můžeme hypotézy týkající se jeho vzniku rozdělit do dvou kategorií, na teorii endosymbiotickou a teorii autogenního původu (*Gupta a Golding, 1996; Dacks a Field, 2007*).

V současnosti se však teorie endosymbiotického původu ER zdá být méně pravděpodobná než teorie autogenního původu (*Dacks a Field, 2007*). Dnes již známe četné zástupce prokaryot, kteří vykazují znaky typické pro membránový transportní systém. Archaea rodu *Ignicoccus* mají v periplazmatickém prostoru membránové vezikuly, které se patrně odškrucují z cytoplazmatické membrány (*Rachel et al., 2002*). Eubakterie rodu *Pirellula*, z čeledi Planctomycetaceae, mají nukleoid obalený jednou dvouvrstvou membránou a eubakterie rodu *Gemmata*, ze stejné čeledi, mají nukleoid ohraničen dvěma dvouvrstvými membránami a v cytoplazmě mají váčky. Jedná se však spíše o analogické znaky, než o přímou homologii s eukaryoty (*Fuerst a Webb, 1991; Lindsay et al., 1997; Dacks a Field, 2007*).

U *Escherichia coli* se při uměle vyvolaném nedostatku translokonů či signál rozpoznávajících částic (SRP, z angl. signal recognition particle) vytvářejí v cytoplazmě buňky četné membrány. Herskovits a kolektiv z toho usuzují na evoluční konzervovanost mechanismů souvisejících s cílením ribozomů na membránu ER a formováním sítě intracelulárních membrán (*Herskovits et al., 2002*). Podobně u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* při vystavení buněk stresu v endoplazmatickém retikulu (zablokováním některého z kroků vedoucích ke správnému sbalení proteinů) dochází k vytváření nových cisteren drsného ER, které pomáhají buňce zvládnout tento stav (*Schuck et al., 2009*).

S ohledem na výše zmíněné můžeme tedy usuzovat, že ER a zbytek membránového transportního systému vznikly autogenním způsobem, při kterém byly při vývoji využity již existující domény a motivy spolu s dostupnou sadou proteinů (genů) eukaryotického předka, případně byly získány genovým transferem v časném stádiu vývoje. Přestože počet homologních struktur či proteinů, které jsou spojené s eukaryotickým membránovým transportním systémem, je u prokaryot omezený, zdá se teorie autogenního původu pravděpodobnější. Pro tuto teorii rovněž svědčí nepřítomnost DNA či dvojitých membrán v organelách membránového transportního systému, které jsou charakteristickými znaky organel endosymbiotického původu (*Dacks a Field, 2007*).

2.2 Jaderný obal

Jaderný obal (NE, z angl. nuclear envelope) je složen ze dvou dvouvrstvých membrán, mezi kterými je perinukleární prostor. Vnější jaderná membrána přechází v membránu periferního endoplazmatického retikula a perinukleární prostor je kontinuální s lumen periferního ER, což dokazuje, že jaderný obal je součástí ER. Přibližně 1/10 povrchu NE tvoří jaderné póry, které umožňují selektivní výměnu látek mezi cytoplazmou a nukleoplazmou. V oblastech jaderných pórů jsou vnitřní a vnější

jaderné membrány kontinuální (Watson, 1955). Pro tvorbu pórů, respektive komplexů jaderných pórů (NPC, z angl. nuclear pore complex) je u kvasinek i savců nutná kombinace některého proteinu z rodiny retikulonů (Rtn) s proteiny Yop1/DP1 a proteiny ze skupiny integrálních membránových proteinů póru (Pom) (Dawson *et al.*, 2009). Na vnější jadernou membránu nasedají ribozomy, stejně jako na další doménu endoplazmatického retikula – drsné ER (Palade, 1955).

NE vzniká z tubulárního ER, přičemž klíčovou roli hrají chromatin a DNA vazebné proteiny v membráně tubulárního ER. V *in vitro* experimentech dochází ke vzniku jaderného obalu rychleji, pokud je DNA zbavena všech proteinů. Je pravděpodobné, že histony nehrají při tomto procesu významnou roli, přinejmenším ne *in vitro*. Při tvorbě NE z intaktního ER není třeba energie z ATP ani GTP. Proteiny i lipidy v membránách NE pocházejí z membrán ER. V průběhu mitózy či meiózy jsou proteiny jaderné membrány v membráně ER (Anderson a Hetzer, 2007).

V jaderném obalu je nejméně 148 různých proteinů a obě membrány se mezi sebou liší svým proteinovým složením. Například ve vnitřní jaderné membráně jsou protein LUMA a myší homolog proteinu Sun1, které se ve vnější membráně nenacházejí (Dreger *et al.*, 2001).

Charakteristickými proteiny NE u savců jsou nespriny (z angl. nuclear envelope spectrin repeat) (Lynes a Simmen, 2011). U člověka jsou nesprin-1 a -2 (a jejich různé izoformy) exprimovány ve všech tkáních, avšak s různou mírou exprese. Kromě jaderného obalu jsou nespriny lokalizovány i jinde – v jádře (heterochromatinové oblasti a nukleolus u nesprinu-1) a v cytoplazmě (Zhang *et al.*, 2001).

Nesprin-2 je lokalizován ve vnější jaderné membráně a v cytoplazmě (v oblasti Golgiho aparátu). Váže aktin, urychluje jeho polymeraci a zajišťuje tak tvar jaderného obalu (mikrotubuly nemají na změny tvaru vliv). Rovněž je možné, že hraje roli při transportu RNA a proteinů v nukleoplazmě (Zhen *et al.*, 2002). V nukleoplazmě savčích buněk se stejně jako v cytoplazmě nachází aktin, polymeruje zde a může se účastnit regulace transkripce (Lane, 1969; Welch a Suhan, 1985). Je možné, že na regulaci polymerace aktinu v nukleoplazmě se podílejí (mimo jiné) i membránově vázané nespriny (Padmakumar *et al.*, 2005).

Na C-konci nesprinů je konzervovaná doména složená z transmembránové domény typu II a 30 aminokyselinových zbytků, které jsou v perinukleárním prostoru. Těchto 30 aminokyselinových zbytků tvoří luminální doménu, která je nezbytná pro interakci se subdoménou 2 proteinu Sun1 v perinukleárním prostoru. Protein Sun1 zajišťuje propojení nesprinů-1 a -2 s nukleoplazmou a zároveň je nezbytný i pro správnou lokalizaci nesprinu-2 v NE. Sun1 tedy přes nespriny propojuje nukleoplazmu s cytoplazmou (Padmakumar *et al.*, 2005).

Provedl jsem analýzu proteinů NCBI BLAST (basic local alignment search tool, dostupné z URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pro vyhledávání homologií v primárních sekvencích mezi proteiny. Porovnával jsem sekvence lidských proteinů nesprin-1 izoforma 1 a nesprin-2 izoforma 5 (vždy nejdelší varianta daného proteinu) se známými proteinovými sekvencemi kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Algoritmus PSI-BLAST, který vyhledává pozičně-specifická opakování, našel v obou případech více sekvencí homologických k nesprinům, ale ani jedna nesdílí více než 1 doménu, respektive

její část. Podobné výsledky jsem získal i při vyhledávání homologií obou nesprinů ve skupině Fungi. Z toho vyplývá, že kvasinku *S. cerevisiae*, ale ani jiné houby, nelze využít pro studium nesprinů, jaké známe ze savčích buněk.

2.3 Drsné endoplazmatické retikulum

Drsné endoplazmatické retikulum je jednou ze dvou základních domén periferního endoplazmatického retikula a morfologicky většinou odpovídá soustavě paralelně uspořádaných cisteren (angl. sheets) (Shibata *et al.*, 2006).

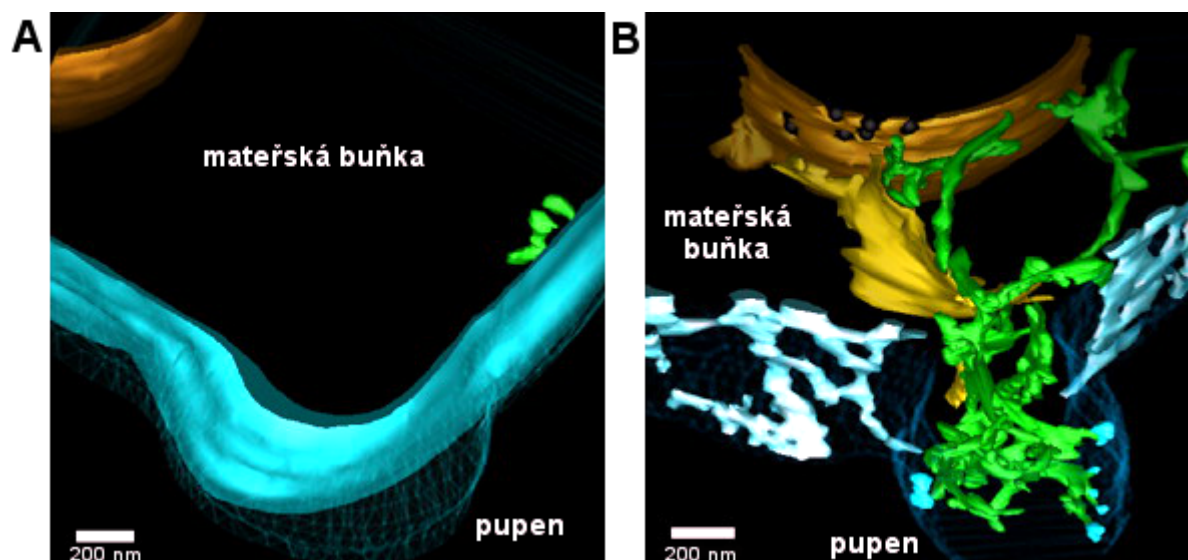
Hlavním znakem drsného ER je přítomnost ribozomů na vnější straně membrány (Palade, 1955). S tím souvisí i hlavní funkce drsného ER, kterou je proteosyntéza membránových proteinů a proteinů určených k sekreci (Lynes a Simmen, 2011). Drsné endoplazmatické retikulum je tedy začátkem sekreční dráhy (Deshaies a Schekman, 1987).

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je jedna centrální cisterna, která vychází z NE a míří v cytoplazmě směrem k pupeni. Z toho lze usuzovat, že tato centrální cisterna je hlavním zdrojem ER pro rostoucí pupen. Na cisterně je navázáno mnoho ribozomů (přibližně 600 až 1 100 ribozomů na μm^2) a její průměr je mezi 17 a 66 nm. S ohledem na její poměr objem/povrch se zdá býti uzpůsobena spíše pro procesy probíhající v jejím lumen, obzvláště v porovnání s tubulárním ER (West *et al.*, 2011).

Mechanismus, jakým jsou formovány cisterny ER, není ani dnes zcela jasný. Zdá se, že u nižších i vyšších eukaryot obecně hrají hlavní roli proteiny stabilizující zakřivení membrány z proteinové rodiny retikulonů a proteinové rodiny DP1/Yop1. Jejich nedostatek vede ke tvorbě cisteren, zatímco jejich zvýšená exprese vede ke transformaci cisteren v tubuly. Jsou lokalizovány na okrajích cisteren a jejich množství určuje poměr mezi cisternami a tubuly. Toto je zřejmě způsob, jakým je regulována morfologie cisteren ER u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Shibata *et al.*, 2010). Při delecí genů kódujících proteiny Rtn1, Rtn2 a Yop1 dojde u *S. cerevisiae* k přeměně periferního ER v jednu velkou cisternu, která je v těsném kontaktu s cytoplazmatickou membránou. Zdá se však, že proteiny Rtn1, Rtn2 a Yop1 pouze stabilizují zakřivení membrány a samotný ohyb membrány je způsoben jiným mechanismem (West *et al.*, 2011).

Na tvaru periferního ER se samozřejmě podílí více faktorů než jen aktuální množství retikulonů a proteinů DP1/Yop1. U kvasinky *S. cerevisiae* dojde při narušení transportu mezi ER a Golgiho aparátem k dezorganizaci struktury ER. Například mutace v genu *SEC27* vede k přeměně tubulů v cisterny. Oproti tomu mutace v genech pro proteiny účastnící se pozdějších kroků sekreční dráhy nemají na morfologii ER vliv. Podobně při narušení dráhy SRP (popsána dále), například mutací v genu *SRP101*, *SRP102* či *SEC65* dojde u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* k přesunu ER z periferních částí buňky a k tvorbě velkých cisteren v blízkosti buněčného jádra. Při delecí genu *SRP101*, *SRP102* či *SRP54* však zůstává morfologie ER nezměněna. V takovémto případě dojde k obnovení morfologie ER díky cílení ribozomů na ER nezávislém na dráze SRP (Prinz *et al.*, 2000).

Také u savců se kromě tohoto základního mechanismu (retikulony a proteiny DP1/Yop1) uplatňují i další proteiny – Climp63, p180 a kinektin. Jejich nedostatek nevede ke ztrátě morfologie typické pro cisterny, ale indukuje rozvolnění cisteren v cytoplazmě. Jednou z jejich funkcí tedy zřejmě je udržovat cisterny ER uspořádané v blízkosti jádra. Podobný účinek mají i na membráně vázané polyzomy (Shibata *et al.*, 2010).



Obr. 1: Srovnání morfologie endoplazmatického retikula kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* u buňky s delecí genů pro proteiny Rtn a Yop1 (A) a buňky s normálním fenotypem (B; tzv. wild-type). Při delecí genů pro proteiny Rtn1, Rtn2 a Yop1 dojde v mateřské buňce k přeměně periferního ER na jednu velkou cisternu, která je lokalizována v blízkosti cytoplazmatické membrány. Oproti tomu v pupeni je ER strukturováno normálně (není vyobrazeno). V mateřské buňce s normálním fenotypem jsou přítomny všechny typické morfologické domény ER – jaderný obal (oranžově), cisterna (žlutě), tubulární ER (zeleně) a ER asociované s cytoplazmatickou membránou (modře). Převzato z West *et al.* (2011).

U savců je distribuce periferního ER v cytoplazmě závislá na buněčném cytoskeletu, konkrétně na mikrotubulech. Nocodazol (droga reverzibilně depolymerující mikrotubuly) způsobí u savčích buněk stažení ER do centrální části cytoplazmy. Oproti tomu aktin (mikrofilamenta) ani vimentin (intermediální filamenta) zřejmě nemají na distribuci periferního ER vliv. Mikrotubuly jsou tedy nezbytné pro expandovaný stav periferního ER (Terasaki *et al.*, 1986; Klopfenstein *et al.*, 1998).

Také u rostlin je pro morfologii periferního ER klíčový cytoskelet. V dělicích se buňkách (od profáze po telofázi) mají na organizaci ER největší vliv mikrotubuly (Gupton *et al.*, 2006). Oproti tomu u buněk v interfázi nemají mikrotubuly vliv a hlavní roli hraje aktin a myozinové motory, které umožňují udržování a přetváření morfologie ER (Sparkes *et al.*, 2009). U houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je ER na periférii buňky poměrně statické, ovšem hlouběji do buňky je velmi dynamické – je pohyblivé a prochází kontinuální přestavbou. Pro dynamiku je nutný již zmíněný aktinový cytoskelet a myozinové motory třídy XI, zvláště pak myozin XI-K. Pohyb ER je také zodpovědný za vznik cyklózy, neboli cytoplazmatického proudění v rostlinných buňkách (Ueda *et al.*, 2010).

Naproti tomu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nemá cytoskelet na morfologii ER vliv. Pro zachování dynamiky periferního ER jsou ovšem důležitá aktinová filamenta (*Prinz et al., 2000*).

Protein p180 je transmembránový protein ER u savců, který byl dříve spojován hlavně se schopností vázat ribozomy. U psů má protein p180 (93% homologie s lidským proteinem p180) na svém N-konci 28 nenabitých aminokyselinových zbytků (v pozici 6–33), které fungují jako kotva v membráně ER, kdy C-konec je orientován do cytoplazmy. Blízko N-konce je oblast 54 tandemových repetit a právě tato doména je zodpovědná za vazbu ribozomů (*Wanker et al., 1995, Becker et al., 1999*). Kromě toho má protein p180 také doménu vázající mikrotubuly (MTB-1, z angl. microtubules binding), která rovněž umožňuje dimerizaci proteinů p180. Doména MTB-1 iniciuje tvorbu svazků mikrotubulů a při zvýšené expresi genu pro protein p180 zvyšuje acetylaci mikrotubulů, a tím je stabilizuje. Protein p180 má vliv na proliferaci hladkého, případně drsného ER (záleží na buněčném typu) a je také potřebný pro distribuci periferního ER v cytoplazmě – při jeho nedostatku dochází ke stažení ER do centrální části buňky (*Ogawa-Goto et al., 2007*). U kvasinky *S. cerevisiae* silná heterologní exprese psího genu pro protein p180 indukuje tvorbu funkčního drsného ER o šířce 80–100 nm, které je rozvolněné v cytoplazmě. Rovněž dojde ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny sekreční dráhy, jako jsou *KAR2*, *SEC61*, *SEC72*, *OST1* či *SAC1* a také ke zvýšení celkové sekrece (*Becker et al., 1999*).

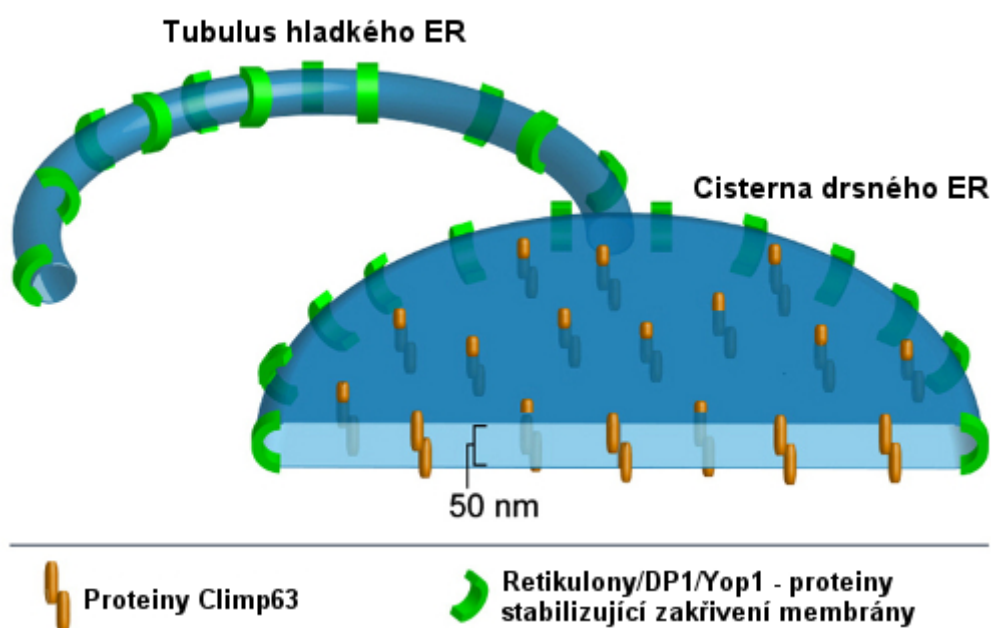
Protein Climp63 je další protein s vazebnou doménou pro mikrotubuly v membráně drsného ER savců. Za vazbu mikrotubulů jsou zodpovědné aminokyselinové zbytky 24–101. Při zvýšené expresi genu pro Climp63 dochází k nahloučení periferního ER v okolí jádra, stejně jako při delecí aminokyselin 24–101 (*Klopfenstein et al., 1998*). Buňky se zvýšenou expresí genů kódujících proteiny p180 či Climp63 mají stejný typ ER, přestože tyto proteiny nemají žádnou sekvenční homologii (*Ogawa-Goto et al., 2007*). Pro savčí proteiny Climp63 a p180 není znám žádný kvasinkový ortolog (*Dejgaard et al., 2010*).

Jedním z charakteristických proteinů drsného ER je právě protein Climp63 (*Lynes a Simmen, 2011*). Kromě výše uvedených funkcí reguluje šířku lumen cisteren drsného ER, a tím zřejmě vytváří vhodné podmínky pro chaperony v lumen ER a zároveň minimalizuje prostor, který zabírá drsné ER v cytoplazmě (*Shibata et al., 2010*).

Kromě proteinů vázajících mikrotubuly má na morfologii ER vliv také to, v jaké části buněčného cyklu se buňka nachází. V savčích buňkách v interfázi jsou cisterny drsného ER lokalizovány hlavně v centrální části buňky, zatímco tubuly jsou převážně v blízkosti cytoplazmatické membrány. V průběhu mitózy (metafáze až anafáze) je ER přeměněno v soustavu krátkých, bohatě větvených tubulů a je zcela bez cisteren. V těchto fázích je jaderný obal součástí periferního ER. V období prometafáze až anafáze se sníží počet ribozomů vázaných na membránu ER o 70 %. S ohledem na roli polyzomů při stabilizaci morfologie cisteren se zdá, že právě toto je mechanismus, jakým dochází k přeměně cisteren v tubuly v průběhu mitózy (*Puhka et al., 2007*).

Jak již bylo zmíněno, drsné ER je místem, kde dochází k translaci transmembránových proteinů, či proteinů určených k sekreci. Proteosyntéza začíná v cytoplazmě na volných ribozomech. Vznikající polypeptid určený k sekreci nebo integraci do membrány má na svém N-konci aminokyselinovou signální

sekvenci, na kterou se váže signál rozpoznávající částice (SRP) a zastavuje jeho syntézu v cytoplazmě (Lingappa et al., 1977; Walter et al., 1981). SRP je nukleoproteinový komplex složený z šesti proteinů a jedné 7S RNA. Pro správnou funkci SRP je nutná jak RNA, tak všech 6 proteinů (Walter a Blobel, 1980; Walter a Blobel, 1982). Nově vznikající protein se signální sekvencí zvyšuje afinitu SRP k polyzomu 6 000× (*in vitro*) (Walter et al., 1981). SRP poté navede celý polyzom na SRP receptor na membráně ER, kde dojde k obnovení translace a kotranslační translokaci syntetizovaného proteinu do ER (Gilmore et al, 1982; Walter a Blobel, 1981).



Obr. 2: Model formování cisteren a tubulů endoplazmatického retikula v savčích buňkách. Proteiny Climp63 spolu interagují přes domény v lumen ER a vytváří tak planární struktury cisteren drsného ER. Proteiny stabilizující zakřivení membrány (retikulony, DP1/Yop1) jsou na okrajích cisteren a v tubulech hladkého ER. Převzato ze Shibata et al. (2010).

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou proteiny určené k sekreci transportovány do ER pomocí proteinu Sec61. Protein Sec61 je lokalizován v membráně drsného endoplazmatického retikula a vytváří translokační kanál mezi cytoplazmou a lumen ER, kterým prochází translatovaný protein. Bez proteinu Sec61 není kvasinka schopná růstu. Zajímavá je rovněž podobnost aminokyselinové sekvence proteinu Sec61 a homologu proteinu SecY u archaea *Methanococcus vanneilli*, která poukazuje na evoluční konzervovanost tohoto proteinu (Stirling et al., 1992). Protein Sec61 není v membráně drsného ER sám. Spolu s proteiny Sbh1 a Sss1 (homology savčích podjednotek Sec61β a Sec61γ) vytváří heterotrimerní komplex Sec61 (Panzner et al., 1995). Protein Sec61 také může spolu s proteiny Sec62, Sec63 a dalšími dvěma polypeptidy vytvářet multipodjednotkový komplex, který usnadňuje translokaci proteinů do ER. V membráně drsného ER kvasinky *S. cerevisiae* jsou pak proteiny Sec61, Sec62 a Sec63 zastoupeny v poměru 14 : 1 : 5 (Deshaies et al., 1991).

Studie organizace savčího translokonu Sec61 provedená pomocí nativní elektroforézy s vysokým rozlišením ukázala, že na interakci ribozomu a translokonového komplexu Sec61 se podílí nejméně

62 proteinů. Kromě proteinu Sec61 α a proteinů ribozomu jsou to například proteiny ribophorin I a II, p180, Climp63, kinectin, chaperon Erdj3 a další (Dejgaard *et al.*, 2010). Zdá se, že translokonomové komplexy jsou seskupeny ve velkých raftech, ve kterých se rovněž uplatňuje protein Climp63. Climp63 na sebe váže cytoplazmatické mikrotubuly a snižuje tak laterální mobilitu seskupených translokonomových komplexů v membráně drsného ER. Nikonov a kolektiv se domnívají, že může jít o mechanismus umožňující vytváření dalších domén v rámci drsného ER, které jsou specializovány na syntézu určitých skupin proteinů. Na rozdíl od jaderného obalu se zde neuplatňují aktinová filamenta (Zhen *et al.*, 2002; Nikonov *et al.*, 2007).

Pór uvnitř translokačního komplexu propojující cytosol a lumen ER existuje nezávisle na translaci, pouze po nasednutí ribozomu se pór rozšíří, aby jím mohl projít syntetizovaný protein. Důležitou roli zde hraje protein BiP (Kar2), který se váže v lumen ER na pór a uzavírá jej, pokud právě neprobíhá kotranslační translokace. Zde je navázán do doby, než syntetizovaný protein dosáhne délky 70 aminokyselinových zbytků, poté pór uvolní a protein může pokračovat do lumen ER. Touto regulací průchodnosti póru pomáhá protein BiP udržovat gradient Ca^{2+} , a tím i homeostázu celé buňky (Hamman *et al.*, 1998).

Po průchodu proteinu přes translokón do lumen ER je signální peptidázou kotranslačně odštěpena jeho signální sekvence (Lingappa *et al.*, 1977). Dochází ke kotranslační tvorbě disulfidických můstků, v případě glykoproteinů k N-glykosylaci asparaginových zbytků a úpravám přidaných sacharidů, asociaci s calnexinem a kotranslačnímu sbalení proteinu, které je usnadněno již zmíněnými procesy (Chen *et al.*, 1995).

K translokaci proteinů do ER nemusí docházet jen kotranslačně, některé proteiny mohou být translokovány posttranslačně. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je 20–30 % celkového množství proteinu Sec61 ve velkém komplexu Sec, který kromě proteinů Sec61, Sbh1 a Sss1 obsahuje ještě proteiny Sec62, Sec63, Sec71 a Sec72. Studie prováděné *in vitro* potvrdily, že právě tento velký komplex umožňuje posttranslační translokaci proteinů do ER. Rovněž se zdá, že přinejmenším pro některé proteiny je pro posttranslační translokaci nutný ještě protein BiP (Kar2) a ATP (Panzner *et al.*, 1995).

2.4 Hladké endoplazmatické retikulum

Hladké endoplazmatické retikulum je druhou základní doménou periferního ER a vyznačuje se tubulární morfologií. Jeho název poukazuje na nepřítomnost ribozomů na jeho membráně. Místo proteosyntézy je tak hladké ER místem pučení a fúze váčků a rovněž umožňuje kontakt s dalšími buněčnými organelami (Shibata *et al.*, 2006).

V současné době je však i hladké ER rozdělováno do dalších domén, které se mezi sebou liší funkcí a svým proteinovým složením. Lynes a Simmen shrnují pro hladké ER tyto domény: oblast membrány hladkého ER, která je v kontaktu s mitochondrií (MAM, z angl. mitochondria associated membrane), oblast membrány hladkého ER, která je v kontaktu s cytoplazmatickou membránou (PAM, z angl. plasma membrane-associated membrane), doménu, odkud pučí váčky anterográdním směrem

(ERES, z angl. ER exit site) a doménu určenou ke kontrole a odstraňování proteinů z ER (ERQC, z angl. ER quality control compartment). Oba autoři do hladkého ER rovněž umísťují počátek biogeneze tukových kapének a peroxizomů (*shrnutí v Lynes a Simmen, 2011*).

Název hladké ER však není příliš přesný. Elektronová tomografie pučících buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* odhalila, že ribozomy nejsou z tubulárního ER zcela vyloučeny, ale jsou přítomny v hustotě přibližně 250 až 400 ribozomů na μm^2 (oproti přibližně 600 až 1 100 ribozomů na μm^2 u cisterny drsného ER). V případě PAM je hustota ribozomů na straně obrácené do cytoplazmy přibližně mezi 550 a 900 ribozomy na μm^2 , zatímco směrem k cytoplazmatické membráně je hustota ribozomů vázaných na PAM prakticky nulová. Přestože zakřivení membrány hraje roli v denzitě ribozomů na jednotlivých částech ER, lze se domnívat, že ribozomy nejsou vyloučeny z tubulárního ER jen na základě zakřivení membrány, ale i dalším mechanismem, případně více mechanismy (*West et al., 2011*).

Tubulární morfologie hladkého ER je dána hlavně proteiny z rodin retikulonů a DP1/Yop1, které stabilizují zakřivení membrány typické pro tubuly (*Shibata et al., 2010*). V pučících buňkách kvasinky *S. cerevisiae* tubuly pocházejí z jaderného obalu (stejně jako cisterna drsného ER) a obvykle jich je 6–8. Jsou rozprostřeny v cytoplazmě a propojují jaderný obal s cisternou, cisternu s PAM, PAM s další PAM a také jsou v kontaktu s dalšími buněčnými organelami. Průměr tubulů je mezi 10 a 76 nm, v případě PAM mezi 20 a 63 nm. Průměrná šířka je však v rámci periferního ER (drsné, hladké – tubuly a PAM) prakticky stejná, tedy v rozmezí mezi 35–38 nm (*West et al., 2011*).

PAM má jak tubulární, tak cisternovitý charakter (s fenestracemi) a je v kontaktu s 10–45 % cytoplazmatické membrány. Při delecí genů pro retikulony a protein Yop1 toto číslo vzroste na 54–60 %. Z toho lze usoudit, že další funkcí proteinů stabilizujících zakřivení membrány je regulace množství PAM. Zajímavé je, že na rozdíl od tubulárního ER nepochází PAM z mateřské buňky, ale vzniká v pupeni *de novo* z tubulárního ER. Vzhledem k poměru objem/povrch jsou tubulární ER a PAM vhodnější spíše pro procesy probíhající na jejich membráně než v jejich lumen (oproti cisterně drsného ER) (*West et al., 2011*).

Charakteristickými proteiny hladkého ER savců jsou atlastiny. Tyto proteiny přes své 2 transmembránové segmenty na C-konci interagují v membráně s vlásenkovými kotvami proteinů z rodiny Rtn a rodiny DP1. Při nedostatku atlastinů či při mutaci v jejich doméně vázající GTP jsou tubuly ER dlouhé a nevětvené. Homology atlastinů jsou zřejmě u všech mnohobuněčných eukaryot (včetně *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je místo atlastinů jejich funkční ortolog GTPáza Sey1. Protein Sey1 je lokalizován v tubulech ER, kde interaguje s proteiny Rtn1 a Yop1. Nedostatek proteinu Sey1 nevyvolá změnu morfologie periferního ER, ale pokud je spojen s nedostatkem proteinu Rtn1 či Yop1, dojde ke ztrátě tubulární morfologie a k potížím s přenosem ER z mateřské buňky do pupene. Protein Sey1 je společně s proteiny Rtn1 a Yop1 důležitý pro udržení struktury ER a vyžaduje k tomu vazbu GTP. Homology Sey1 jsou zřejmě přítomny u všech jednobuněčných eukaryot, ale již ne u těch mnohobuněčných (*Hu et al., 2009*).

Zásadní roli má hladké ER v homeostáze vápenatých kationtů (Ca^{2+}). Hladké ER je schopné transportovat Ca^{2+} ven i dovnitř a zároveň je uskladnit (Ca^{2+} je přinejmenším v některých částech hladkého ER hlavním kationem). A právě domény MAM a PAM jsou spojeny s udržováním buněčné homeostázy Ca^{2+} (Hales *et al.*, 1974).

V lidských buňkách tvoří mitochondrie velkou, navzájem pospojovanou tubulární síť, která prochází kontinuální přestavbou. ER pokrývá přibližně 5–20 % povrchu této sítě. V MAM jsou přítomné mikrodomény s vysokou koncentrací Ca^{2+} vytvářené otevřením vápenatých kanálů, ovládaných inositol-1,4,5-trifosfátem (IP_3). V těchto mikrodoménách dochází k rychlému a velkému příjmu Ca^{2+} do mitochondrií (vnější membrána je volně propustná pro ionty). Vápenaté ionty pak mohou procházet v rámci celé mitochondriální sítě a regulovat tak metabolismus mitochondrií. Rovněž mohou na cytosolické straně difundovat ven z mitochondrie do cytoplazmy a ovlivňovat procesy v ní probíhající (Rizzuto *et al.*, 1998). V buňkách krysích jater jsou kontakty mezi mitochondriemi a periferním ER (hladkým, ale i drsným) zajišťovány proteiny, které vytvářejí provazce, jež jsou organizovány do svazků po 6 a více. Tyto svazky jsou od sebe vzdáleny 13–22 nm a udržují vzdálenost mezi mitochondriemi a ER v rozmezí 6–15 nm. Tato vzdálenost je velmi důležitá, protože v nepřítomnosti spojujů nedojde k přenosu Ca^{2+} do mitochondrie, a buňka tak nemůže regulovat mitochondriální metabolismus, například produkci ATP. Naproti tomu, pokud je vzdálenost mezi mitochondrií a ER menší než 6 nm, může zvýšená koncentrace Ca^{2+} v mitochondrii aktivovat některou z drah buněčné smrti (Csordás *et al.*, 2006).

V případě kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je propojení ER s mitochondrií zajištěno komplexem, který sestává ze 4 proteinů – Mmm1, Mdm10, Mdm12 a Mdm34. Tento komplex (označovaný jako ERMES, z angl. ER-mitochondria encounter structure) je lokalizován průměrně do šesti diskretních oblastí v buňce a ve více než 70 % případů je v blízkosti mitochondriální DNA (nukleoidu). Při deleci genu MDM12 dojde až k desetinásobnému snížení počtu nukleoidů (na cca 2 až 4 na buňku). Tento komplex je však potřebný nejen pro mechanické spojení ER a mitochondrie, homeostázu Ca^{2+} či udržování stability mitochondriální DNA, ale také pro transport mitochondrií na větší vzdálenosti, zvláště pak z mateřské buňky do buňky dceřinné. K tomu využívá vazbu aktinových filament a funguje analogicky jako kinetochor při rozchodu chromozomů během buněčného dělení. Proto je tento komplex také označován jako mitochor. Zajímavá je rovněž myšlenka, že by ERMES mohl představovat propojení mezi lumen ER a mitochondriálním genomem. To by buňce dávalo další možnosti v řízení růstu mitochondrií díky regulaci jejich replikace, transportu fosfolipidů či dokonce importu mitochondriálních proteinů (Boldogh *et al.*, 2003; Kornmann *et al.*, 2009).

V současné době není známo, které proteiny plní u savců stejnou funkci jakou má ERMES u kvasinky (Lynes a Simmen, 2011). Je však pravděpodobné, že takovýto komplex obsahuje proteiny ze stejné rodiny, jako jsou Mmm1 a Mdm12 (Kornmann *et al.*, 2009).

Doména MAM je důležitá také pro syntézu membránových fosfolipidů. Na membráně hladkého ER vzniká fosfatidylserin, který je translokován na vnitřní membránu mitochondrie, kde je přeměněn na fosfatidylethanolamin. Při přidání ATP na fyziologickou koncentraci dojde *in vitro* k přibližně

dvojnásobnému zvýšení translokace. Při přidání UDP je toto zvýšení čtyřnásobné. To naznačuje, že jde spíše o nespecifické interakce než o hydrolýzu nukleotidů. Fosfatidylethanolamin je poté transportován zpět na hladké ER, kde je přeměněn na fosfatidylcholin (ATP ani jiné nukleotidy nezvyšují *in vitro* rychlost reakce). Je zajímavé, že transportovány jsou prakticky jen nově vytvořené fosfolipidy, což je zřejmě způsobeno inkorporací dříve vyrobených fosfolipidů do membrány (Vance, 1991). U kvasinky *S. cerevisiae* způsobí mutace v proteinovém komplexu ERMES dvou až pětinašobné snížení rychlosti přeměny fosfatidylserinu na fosfatidylcholin, což je důkazem, že ERMES (respektive MAM) hraje roli v transportu fosfolipidů mezi ER a mitochondrií (Kornmann *et al.*, 2009).

Velmi důležitou doménou v rámci hladkého ER je ERQC, kde probíhá kontrola a odstraňování defektních (nesprávně sbalených) proteinů z ER. U savců je ERQC lokalizován v blízkosti jaderného obalu, respektive centrozomu, a jeho distribuce je závislá na mikrotubulech. Tato lokalizace (v blízkosti jádra) je nejvíce patrná, pokud dojde k akumulaci defektních proteinů určených k degradaci, ale vyskytuje se i přirozeně. V této doméně je rovněž zvýšená koncentrace proteinu Sec61 a dvou chaperonů – kalnexinu a kalretikulinu, ale ne chaperonu BiP (Kamhi-Nesher *et al.*, 2001).

Pro správnou funkci ERQC je u savců důležitý protein Bap31. Ten je lokalizován v periferním ER, ale při akumulaci proteinů určených k degradaci mění svou lokalizaci do ERQC. Toto cyklování je, přinejmenším zčásti, závislé na molekulárních motorech dyneinu-dynaktinu. Protein Bap31 má tři předpokládané transmembránové domény, přičemž transmembránová doména 2 je nutná pro jeho relokaci z ERQC do jiných domén periferního ER a transmembránová doména 3 je nutná pro jeho zacílení z ostatních domén periferního ER do ERQC (Wakana *et al.*, 2008).

Protein Bap31 má důležitou roli v rozhodování o osudu nově syntetizovaných transmembránových proteinů – zda budou pokračovat dále v sekreční dráze, budou zadrženy v ER, či degradovány v cytoplazmě. Protein Bap31 asociuje ihned při kotranslační translokaci s nově vznikajícím proteinem a s translokonem Sec61. Také interaguje s komplexem Derlin-1, přes který cílí retrotranslokací některé proteiny z ER do cytoplazmy (Wang *et al.*, 2008).

Nesprávně sbalené proteiny musí být z ER odstraněny. K tomu slouží ERAD (z angl. ER-associated degradation), tedy dráha, kterou jsou tyto proteiny retrotranslokovány z ER do cytoplazmy, kde jsou polyubiquitinylovány a degradovány v proteazomech. V případě kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou známy 3 dráhy ERAD podle toho, která část proteinu je defektní – tedy zda transmembránová část proteinu, část proteinu orientovaná do lumen (rozpoznávání se účastní protein Kar2) či část orientovaná do cytoplazmy (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006).

U kvasinky *S. cerevisiae* je do retrotranslokace nesprávně sbalených proteinů z lumen ER zapojen již tolikrát zmiňovaný protein Sec61. Mechanismus jeho funkce není zcela jasný. Interaguje s nesbaleným proteinem a poté jej zřejmě navede k proteinu Hrd1, který tvoří (spolu s dalšími proteiny) kanál, přes který je nesbalený protein retrotranslokován do cytoplazmy k degradaci. Rovněž je možné, že protein Sec61 se sám aktivně účastní tvorby kanálu (Schäfer a Wolf, 2009).

3. Stres v endoplazmatickém retikulu

3.1 Vznik stresu v endoplazmatickém retikulu

Stres v endoplazmatickém retikulu nastává, pokud dojde k narušení procesů probíhajících za normálních podmínek v ER. K těmto procesům patří syntéza sterolů, lipidů, komponentů buněčné stěny (u nižších eukaryot) a zvláště pak translace, posttranslační modifikace a transport transmembránových proteinů či proteinů určených k sekreci (*shrnuto ve Schröder a Kaufman, 2005*). K narušení homeostázy ER a vzniku stresu dochází obvykle vlivem nesprávně sbalených proteinů a jejich akumulací. To může být způsobeno vnitřními i vnějšími podněty působícími na buňky (*Rutkowski a Kaufman, 2004*).

Mutace či poškození DNA v kódujících oblastech genů pro proteiny sekreční dráhy a proteiny spojené s kontrolou a degradací proteinů v ER mohou vést ke vzniku stresu. Příkladem je záměna tyrosinu v dityrosinovém motivu (pozice 343. a 344.) v proteinu Sec61 α 1 za histidin vedoucí ke stresu v ER u β buněk slinivky břišní a v jaterních buňkách (*Lloyd et al., 2010*).

Stres v ER může být rovněž vyvolán virovou infekcí. Virus hepatitidy C (+ RNA virus, Flaviviridae) využívá při svém replikačním cyklu membránu ER. Syntéza proteinů jeho virového obalu vede k indukci stresu v ER v jaterních buňkách a ke snížení koncentrace Ca²⁺ v ER (*Benali-Furet et al., 2005*). Dalšími onemocněními spojenými se stresem v ER jsou různé typy rakoviny, například glioblastom či děložní adenokarcinom. U obou zmíněných typů je indukován stres v ER, ale zároveň jsou aktivovány dráhy sloužící k jeho překonání. Důležitou roli pro přežívání nádorových buněk hraje protein BiP a v případě glioblastomu také protein Sec61 γ (*Lu et al., 2009; Bifulco et al., 2012*). Rovněž se ukazuje, že stres v ER je jedním z klíčových faktorů onemocnění nervové soustavy jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova či Kennedyho choroba, prionová onemocnění, cerebrální ischemie, mozková traumata, syndrom fragilního chromozomu X, amyotrofni laterální skleróza či myotonická dystrofie (*shrnuto v Yang a Paschen, 2009*).

V buněčné kultuře odvozené z lidských keratinocytů je možné vyvolat stres v ER pomocí UVB záření. V současné době však není jisté, zda spálení sluncem způsobuje stres v ER také *in vivo* (*Mera et al., 2010*). Stres v ER může být rovněž vyvolán homocysteinem, který způsobuje redukční stres a narušuje redoxní rovnováhu ER (*Outinen et al., 1998; Werstuck et al., 2001; Ji a Kaplowitz, 2003*).

V poslední době se v souvislosti se životním prostředím často zkoumá vliv těžkých kovů na zdraví živočichů a člověka. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kadmium (Cd²⁺) indukuje stres v ER. Cd²⁺ se hromadí v ER a kromě vyvolání stresu také narušuje metabolismus vápníku. Oproti tomu arsen (As³⁺) a rtuť (Hg²⁺) stres v ER u kvasinky nezpůsobují (*Gardarin et al., 2010*). V kultivovaných prasečích ledvinných epiteliálních buňkách kadmium (Cd²⁺), ale i rtuť (Hg²⁺) indukují vznik stresu v ER. Ostatní testované kovy – mangan (Mn²⁺), zinek (Zn²⁺) a olovo (Pb²⁺) však stres v ER nevyvolávají (*Liu et al., 2006*).

Nedávný výzkum prováděný na kvasince *S. cerevisiae* rovněž ukazuje na propojení mezi buněčnou stěnou a stresem v ní s ER a stresem v něm. Stres v buněčné stěně vyvolává stres v ER,

a naopak stres v ER může vyvolat stres v buněčné stěně. Zdá se, že tyto dvě buněčné odpovědi na dva různé stresy jsou společně regulovány ve snaze předcházet oběma typům stresu (*Scrimale et al., 2009*).

Zajímavé je rovněž spojení stresu v ER s vývojem některých buněčných typů. Například u B lymfocytů jsou při jejich diferenciaci v plazmatickou buňku (určenou k sekreci protilátek) aktivovány buněčné mechanismy odpovědi na stres v ER (*Gass et al., 2002*). Při vývoji oční čočky u myši, konkrétně při diferenciaci epiteliálních buněk v buňky vláknité, dochází rovněž k indukci mechanismů podílejících se na překonávání stresu v ER (*Firtina a Duncan, 2011*). Podobně je tomu u β buněk slinivky břišní, kde stres v ER a dráhy sloužící k jeho překonání určují osud buňky a podílejí se na regulaci syntézy a sekrece inzulinu (*shrnuto v Ortsäter a Sjöholm, 2007*).

Rovněž se zdá, že stres v ER a mechanismy vedoucí k jeho překonání jsou součástí buněčného cyklu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Například mechanismy kontroly kvality proteinů v ER jsou zásadní pro správnou funkci proteinů buněčné stěny (*Scrimale et al., 2009*). Stres v ER vyvolává zpoždění při buněčném dělení ve fázi cytokineze, což vede ke zvýšení ploidie buněk. Bylo zjištěno, že mechanismy vedoucí k překonání stresu v ER (např. UPR, viz kapitola 3.2) mají stálou (bazální) aktivitu. To zřejmě umožňuje, aby regulovaly funkce ER v rámci adaptace na různé podmínky, mimo jiné právě na buněčné dělení (*Bicknell et al., 2007*). Tyto mechanismy jsou také nutné pro udržení stálosti genomu. Při delecí genu *IRE1* dochází 10× častěji ke ztrátám chromozomů ve srovnání s buňkami s funkčním genem *IRE1*. Pokud je v buňkách s delecí *IRE1* indukován stres v ER, jsou chromozomové ztráty ještě častější (*Henry et al., 2010*).

Nedávná studie nečekaně ukázala, že stres v ER nemusí být vyvolán jen akumulací proteinů v ER. McKibbin a kolektiv použili selektivní nízkomolekulární inhibitor eeyarestatin 1, který kromě inhibice ERAD vede také k inhibici translokace proteinů do ER přes proteinový komplex Sec61. To má za následek akumulaci nesbalených, ubiquitinylovaných proteinů v cytoplazmě a indukci stresu v ER. Příčina vzniku stresu v ER však není v tomto případě zcela jasná (*McKibbin et al., 2012*).

V experimentálních podmínkách se k vyvolání stresu v ER využívají dva základní přístupy. První vede k inhibici sbalení proteinu v ER a druhý je založen na expresi mutantních, sbalení neschopných, proteinů. Pro první přístup jsou typické inhibitory přidávané ke kultivovaným buňkám, například: tunikamycin – inhibuje N-glykosylaci proteinů (1 $\mu\text{g/ml}$ či 2,5 $\mu\text{g/ml}$), 2-deoxy-D-glukóza – inhibuje glykosylaci proteinů (1–5mM), dithiothreitol – inhibuje vznik disulfidických můstků (10mM či 20mM), β -mercaptoethanol – inhibuje vznik disulfidických můstků (10–100mM) a mikonazol – inhibuje syntézu ergosterolu v ER (až 20 μM). Hodnoty v závorce jsou koncentrace daného inhibitoru používané u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*Bonilla et al., 2002; Bonilla a Cunningham, 2003; Back et al., 2005; Gardarin et al., 2010*).

U kvasinky *S. cerevisiae* se kromě uvedených látek používají k inhibici sbalování proteinů v ER také kmeny s termosenzitivními mutacemi alel genů kódujících proteiny zapojené do kontroly sbalování a posttranslačních modifikací proteinů v ER. Mutace v genu *SEC53* pro protein sekreční dráhy vede k inhibici N-glykosylace proteinů v ER, což má za následek nesprávné sbalení proteinů. Inhibiční vliv na

sbalování proteinů má také termosenzitivní mutace v genu *KAR2*, který kóduje protein Kar2 (alias BiP). Výhodou těchto genových mutací citlivých na teplotu je, že se neprojeví při permissivní teplotě (24°C), ale až při přesunu buněk do teploty nepermissivní (37°C). Kromě toho může být stres v ER vyvolán expresí genů kódujících proteiny neschopné sbalení, či uměle zvýšenou expresí některých genů. Experimentálně se obvykle používají tyto: mutovaná karboxypeptidáza Y, deletovaná verze aspartátové proteázy z houby *Rhizopus niveus* či cytochrom P450 z kvasinky *Candida maltosa* (shrnutí v Back et al., 2005).

3.2 Buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

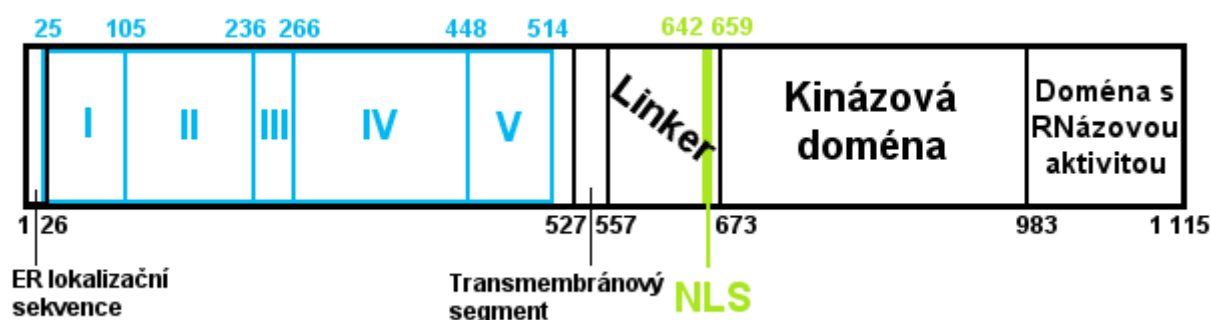
Narušení buněčné homeostáze, respektive procesů spojených s endoplazmatickým retikulem, vede v mnoha případech k indukci stresu v ER (viz kapitola 3.1). Stres v ER je většinou spojen s nesprávným sbalováním proteinů vedoucím k jejich akumulaci v ER. Nesbalené, či jen částečně sbalené proteiny zaujímají konformaci, která je z termodynamického hlediska méně výhodná než konformace nativní, při které má sbalený protein nejnížší možnou Gibbsovu volnou energii. Vystavením hydrofóbních úseků (úseků s převahou aminokyselinových zbytků hydrofóbní povahy) na povrch proteinu (v nativní konformaci by tyto úseky byly skryty uvnitř proteinu) dojde ke zvýšení uspořádanosti okolních molekul vody, což má za následek nárůst Gibbsovy volné energie (Schröder a Kaufman, 2005). Nesbalené, a tedy nefunkční či jen částečně funkční proteiny, se poté mohou akumulovat v ER. Buňka má v zásadě dvě cesty, díky kterým může tento problém překonat. První možností je již zmíněný ERAD, který hraje klíčovou roli při odstraňování proteinů z ER v nestresovaných buňkách (viz kapitola 2.4). Pokud je v důsledku akumulace proteinů vyvolán stres v ER, dochází k buněčné odpovědi na nesbalené proteiny (UPR, z angl. unfolded protein response), která vede ke změnám exprese genů kódujících proteiny spojené s posttranslačními modifikacemi, chaperony, proteiny sekreční dráhy a další (Travers et al., 2000).

Přenos signálu z lumen ER do jádra v případě akumulace nesbalených proteinů v ER zajišťuje u kvasinky *S. cerevisiae* protein Ire1 (alias Ern1), který aktivuje UPR. Gen *IRE1* (alias *ERN1*), kódující protein Ire1, není esenciální – buňky s delecí *IRE1* rostou na bohatém médiu (s přidaným inositolem, protože delece *IRE1* vede k auxotrofii na inositol) stejně jako buňky s genem *IRE1* a nejsou citlivé ke snížené ani zvýšené teplotě (rostou i při 37°C). Pokud však dojde ke stresu v ER a k akumulaci nesbalených proteinů v ER, gen *IRE1* se stává velmi důležitým a buňky s jeho delecí mají sníženou růstovou rychlost, nejsou schopné tvořit kolonie či hynou (v závislosti na typu a síle induktoru stresu v ER). *IRE1* je transkribován jako 1 mRNA o délce přibližně 3 900 bází s velmi nízkou konstitutivní expresí, která není zvýšena ani při UPR. *IRE1* mRNA má jeden otevřený čtecí rámec (3 345 bází) kódující protein o délce 1 115 aminokyselinových zbytků s molekulovou hmotností přibližně 127 kDa (Cox et al., 1993; Mori et al., 1993; Haynes et al., 2004).

Protein Ire1 má topologii typickou pro transmembránové proteiny typu I: N-konec je v lumen ER a C-konec je v cytoplazmě. Na N-konci proteinu Ire1 je signální peptid (sekvence lokalizující protein do ER). Ten je tvořen 3 kladně nabitými aminokyselinovými zbytky, za kterými je 12 nenabitých či

hydrofóbních aminokyselinových zbytků. Na N-konci jsou také 4 asparaginové zbytky, které mohou být N-glykosylovány. Přibližně uprostřed proteinu (aminokyselinové zbytky 527–556) je hydrofóbní oblast kotvící Ire1 do membrány ER. Na C-konci (aminokyselinové zbytky 557–672) je proteinová spojka, tzv. linker. Za linkerem (aminokyselinové zbytky 673–982) je katalytická kinázová doména, která je z 27 % identická a ze 46 % sdílí podobnost s kinázovou doménou proteinu Cdc28 (kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*) a s proteinem Cdc2+ (kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*). V rámci kinázové domény je peptidová sekvence DLKPQN (aminokyselinové zbytky 797–802), která je velmi blízká typické serin/threoninové kinázové sekvenci DLKPEN. Kinázová doména je nezbytná pro funkčnost proteinu Ire1. Svoji strukturou je tak Ire1 podobný receptorům růstového faktoru třídy I. Je také první popsanou transmembránovou receptorovou kinázou u kvasinky (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993; Welihinda a Kaufman, 1996; Welihinda *et al.*, 1998; Goffin *et al.*, 2006).

Na C-konci za kinázovou doménou je oblast 130 (někteří autoři uvádějí až 135) aminokyselinových zbytků, která se velmi podobá savčí endonukleáze RNáze L. Tato doména má skutečně specifickou endonukleázovou aktivitu nezbytnou pro vystřížení intronu z *HAC1* mRNA. Pro svoji aktivitu vyžaduje endonukleázová doména funkční kinázovou doménu a adenosinové nukleotidy (ATP či ADP), které fungují jako kofaktor (Mori *et al.*, 1993; Sidrauski a Walter, 1997; Korennykh *et al.*, 2009; Chawla *et al.*, 2011).

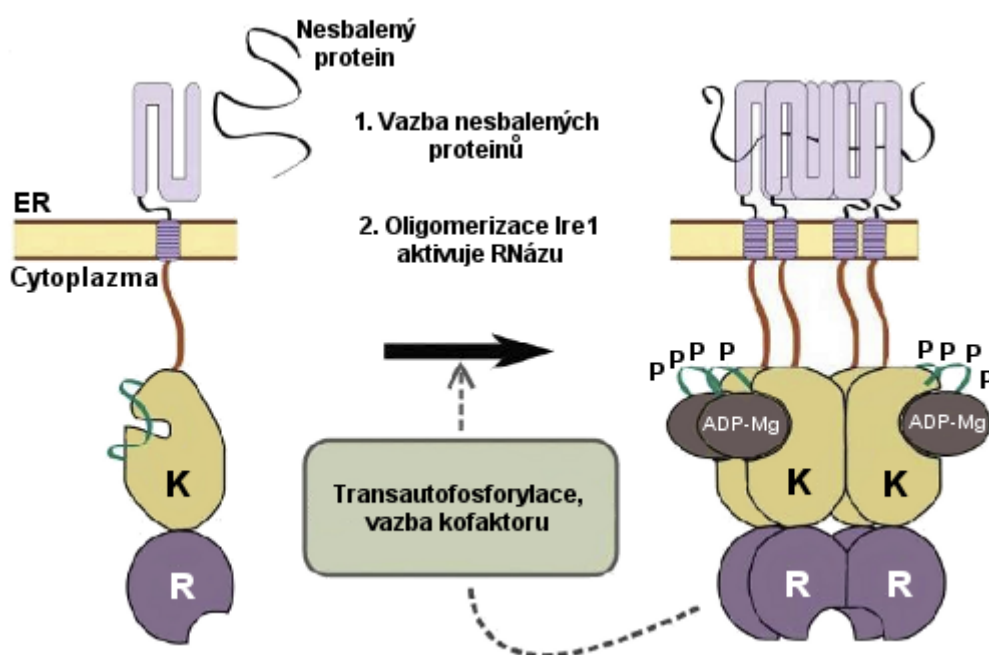


Obr. 3: Model primární struktury proteinu Ire1 (alias Ern1) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Ire1 má délku 1 115 aminokyselinových zbytků a přibližně v polovině své sekvence je rozdělen transmembránovým segmentem kotvícím jej do membrány ER. N-koncová část je v lumen ER a obsahuje signální peptid cílící protein do ER a pět subdomén (I–V, vyznačeno modře), z nichž II. a IV. jsou nutné pro oligomerizaci a spolu s V. se podílí na regulaci Ire1. C-koncová část je složena z linkeru (ten obsahuje NLS, která cílí Ire1 do jádra; vyznačeno zeleně), kinázové domény a domény se specifickou RNázovou aktivitou. Čísla značí začátek, případně konec jednotlivých domén a subdomén. Vytvořeno podle Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993; Goffin *et al.*, 2006 a Korennykh *et al.*, 2009.

Zajímavá je také otázka lokalizace proteinu Ire1. Jeho N-koncová část je vždy v lumen ER, avšak C-koncová část může směřovat do cytoplazmy či do nukleoplazmy. Doména Ire1 – linker totiž obsahuje vysoce bazickou sekvenci (aminokyselinové zbytky 642–659) se 6 aminokyselinovými zbytky (₆₄₂KKKRKR₆₄₇), které jsou nápadně podobné sekvenci cílící proteiny do jádra (NLS, z angl. nuclear localization sequence) velkého T antigenu viru SV40. Za nimi následuje dalších 6 lysinů a argininů. Celkově jsou v linkeru přinejmenším 2 překrývající se NLS – cNLS (aminokyselinové zbytky 642–647,

případně 653–656) a β NLS (aminokyselinové zbytky 646–657). NLS proteinu Ire1 je rozeznávána importinem α (Kap60) a hlavně importiny β (např. Kap95) a pomocí Ran GTPázového cyklu je Ire1 transportován přes jaderný pór do vnitřní jaderné membrány. NLS je nezbytná pro funkční protein Ire1 (Mori *et al.*, 1993; Goffin *et al.*, 2006).

Předpokládaný model fungování proteinu Ire1 je následující – při vzniku stresu v ER a akumulaci nesbalených proteinů v ER dojde k oligomerizaci proteinů Ire1 přes luminální a možná i transmembránové domény. C-koncová oblast za kinázovou doménou rovněž oligomerizuje, což zvyšuje stabilitu oligomerů Ire1. Oligomerizace Ire1 vede k transautofosforylaci proteinů Ire1 v rámci kinázové domény na serinových a threoninových zbytcích (při UPR se fosforylace Ire1 zvýší až 3 \times). Fosforylace serinu₈₄₀, serinu₈₄₁ a threoninu₈₄₄ stabilizuje kinázovou doménu a pomáhá tak oligomerizaci. Vazba kofaktoru (ATP či ADP) podporuje oligomerizaci a zároveň způsobí konformační změnu, a tím aktivaci RNázové domény nezávisle na fosforylaci Ire1. Oligomerizují spolu pouze proteiny Ire1 (jedná se tedy o homooligomerizaci), a to do komplexů větších než dimery. Po překročení určité hraniční koncentrace proteinů Ire1 v oligomeru se již přidávají a aktivují další Ire1 nezávisle na fosforylaci a vazbě kofaktoru. Takto aktivované oligomery jsou poté schopné sestříhnout *HAC1* mRNA. Oligomery Ire1 se akumulují pouze na 3 až 10 místech v buňce, což zřejmě zvyšuje efektivitu sestřihu *HAC1* mRNA (Shamu a Walter, 1996; Welihinda a Kaufman, 1996; Sidrauski a Walter, 1997; Aragón *et al.*, 2009; Korennykh *et al.*, 2009; Chawla *et al.*, 2011).



Obr. 4: Model oligomerizace a aktivace proteinů Ire1 u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. N-koncová doména Ire1 rozezná v lumen ER nesbalené proteiny a dojde k její oligomerizaci s dalšími N-koncovými doménami dalších Ire1. Současně dojde k transautofosforylaci a vazbě kofaktoru (ADP) v rámci kinázové domény (K), což stabilizuje oligomerizaci a aktivuje RNázovou doménu (R). Převzato z Korennykh *et al.* (2009).

Co přesně vede k aktivaci proteinů Ire1, respektive jak je rozpoznáván stres v ER, není ani dnes zcela jasné (*Gardner a Walter, 2011*). Okamura a kolektiv odhalili, že na luminální část proteinu Ire1 se v nestresových podmínkách váže protein Kar2 (alias BiP). Kar2 je chaperon v lumen ER z proteinové rodiny Hsp70, který se váže na nesbalené proteiny a pomáhá jim zaujmout jejich nativní konformaci. Při indukci stresu v ER disociuje Kar2 z Ire1. UPR je citlivá na koncentraci Kar2 a autoři usuzují, že právě protein Ire1 vnímá koncentraci volného Kar2. Protein Ire1 s navázaným proteinem Kar2 má přibližně 5× nižší stupeň vlastní fosforylace. Autoři tedy navrhli model popisující aktivaci proteinu Ire1 – navázaný Kar2 brání Ire1 v oligomerizaci a následné transautofosforylaci, čímž udržuje Ire1 v inaktivním monomérním stavu. Kar2 tedy negativně reguluje aktivaci Ire1 (*Okamura et al., 2000*).

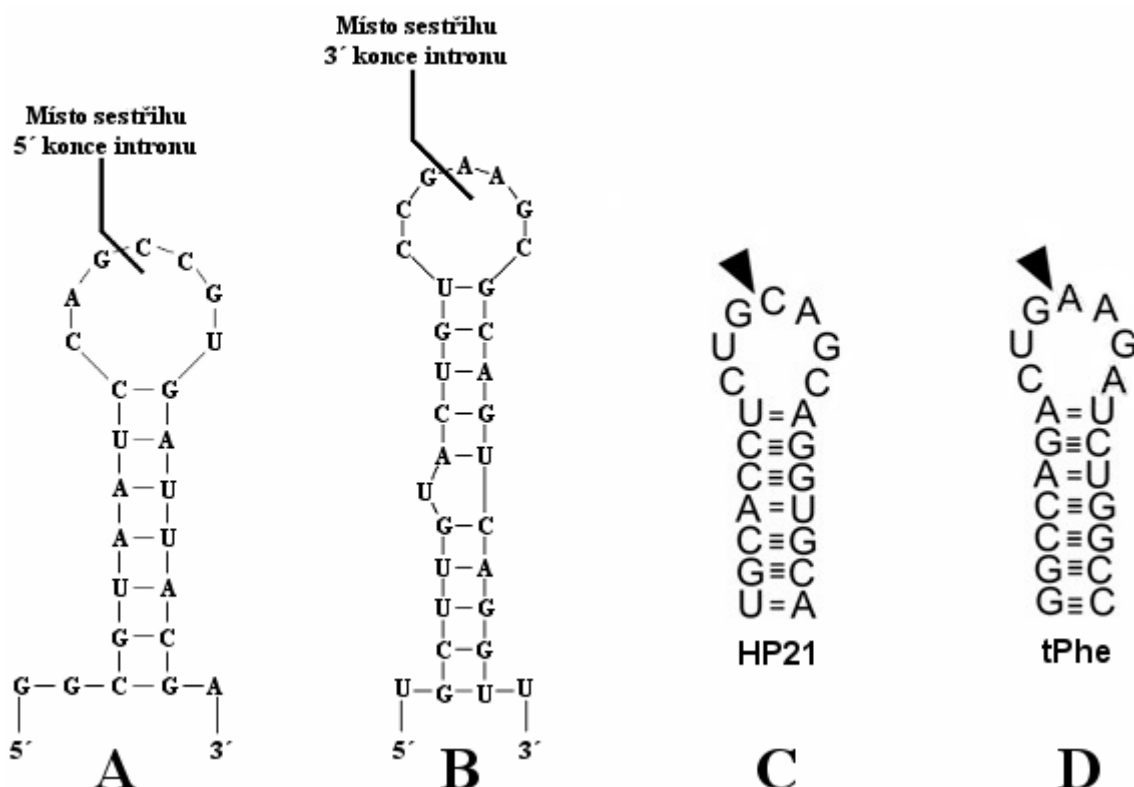
Novější práce však ukázala, že interakce mezi proteiny Kar2 a Ire1 jsou mnohem složitější. Rozsáhlé mapování odhalilo v rámci luminální domény proteinu Ire1 pět subdomén (I–V) – viz Obr. 3. Kar2 se váže na Ire1 v rámci subdomény V. Při delecí subdomény V však nedochází ke konstitutivní aktivaci UPR a v případě vzniku stresu v ER je protein Ire1 s delecí subdomény V schopen indukovat UPR stejně efektivně jako Ire1 se subdoménou V. Kar2 tedy není nutný pro inhibici Ire1, respektive disociace Kar2 ze subdomény V není klíčová pro aktivaci Ire1. Zdá se, že protein Kar2 funguje spíše jako regulátor, který citlivě nastavuje aktivitu Ire1 během stresových podmínek. Protein Ire1 zřejmě může reagovat i na jiné stresy než jen na stres v ER – například pokud jsou buňky vystaveny vysoké teplotě (39°C) či 8% ethanolu. Ve stresových podmínkách tedy Kar2 nastavuje citlivost Ire1 na vnímání stresu pouze v ER. Pro správnou funkci Ire1 jsou rovněž nepostradatelné subdomény II a IV. Právě přes tyto subdomény zřejmě proteiny Ire1 oligomerizují a subdoména II a možná i IV jsou zodpovědné za disociaci Kar2 z Ire1 (*Kimata et al., 2004*).

Nedávný výzkum naznačuje, že ligandem aktivujícím protein Ire1 jsou přímo nesbalené proteiny. Luminální doména Ire1 v *in vitro* podmínkách váže nesbalené proteiny a přitom silně preferuje oblasti s bazickými a hydrofóbními aminokyselinovými zbytky (arginin, leucin, fenylalanin) bez přítomnosti kyselých aminokyselinových zbytků. Zajímavé je, že proteiny rozeznávané chaperonem Kar2 jsou často tytéž, které rozeznává protein Ire1. Vazba nesbalených proteinů na luminální doménu tedy způsobuje oligomerizaci proteinu Ire1, přinejmenším *in vitro* (*Gardner a Walter, 2011*).

Aktivaci transkripce genů kódujících proteiny zapojené v UPR zajišťuje transkripční faktor Hac1 (*Mori et al., 1996*). Sekvence mRNA pro proteiny Hac1/HacA u hub a Xbp1 u živočichů obsahují intron, který je evolučně vysoce konzervovaný. Sekundární struktura typická pro *HAC1/XBP1* mRNA obsahuje na okrajích intronu dvě krátké vlásenky. Na 5' konci intronu páruje intron s exonem proti směru a na 3' konci intronu páruje konec intronu s exonem po směru. Místa sestřihu mRNA pro odstranění intronu jsou uvnitř smyček vlásenek (viz Obr. 5). Místa obou štěpení jsou si podobná a jedná se o degenerované palindromy, které mohou vytvářet pseudouzly (pseudouzly však nejsou evolučně konzervovány). Intron v *HAC1/XBP1* existuje ve 2 formách – dlouhé (>80 nukleotidů, např. u *Saccharomyces cerevisiae*) a krátké (<30 nukleotidů, u savců). U hub se však vyskytují obě formy. Obě formy se kromě délky mírně liší také motivem v místě štěpení na 3' konci, který je rozeznáván proteinem Ire1. Sestřih *HAC1/XBP1* je

evolučně velmi starý a byl přítomen již u společného předka hub a živočichů. Avšak i zde existují výjimky – u některých druhů kvasinek rodu *Candida* a příbuzných rodů intron není, případně nemá typickou 3' vlásenku. U kvasinek rodu *Schizosaccharomyces* nebyla objevena žádná struktura pobobná genu *HAC1*. A v neposlední řadě délka intronu u *Saccharomyces cerevisiae* je výjimečná a je sdílena pouze u blízce příbuzných rodů (Hooks a Griffiths-Jones, 2011).

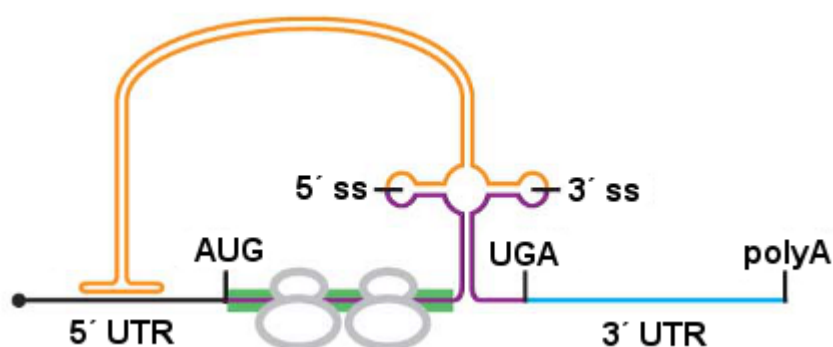
Mechanismus vystřížení intronu z *HAC1* mRNA proteinem Ire1 bude popsán později v rámci této kapitoly.



Obr. 5: Predikce sekundární struktury RNA substrátu rozeznávaného a sestřihovaného proteinem Ire1. A – predikce sekundární struktury 5' konce intronu (12 nukleotidů patří exonu I, zbylých 12 intronu). B – predikce sekundární struktury 3' konce intronu (15 nukleotidů patří intronu, zbývajících 15 exonu II). Místa specifického sestřihu proteinem Ire1 (v typických smyčkách na koncích vlásenek) jsou vyznačena čarou. Sekvence intronu a obou exonů byly získány z online databáze genomových a proteinových sekvencí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Saccharomyces Genome Database, dostupné z URL: <http://www.yeastgenome.org/>) a patří referenčnímu kmeni S288C. Predikce sekundárních struktur jsem vytvořil přes The mfold Web Server verze 2.3 (dostupné z URL: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>) při nastavené teplotě 28°C (teplota, při které se kultivují kvasinky). Predikce A a B jsou ve shodě s již dříve publikovanými predikcemi (Sidrauski a Walter, 1997). C – predikce sekundární struktury experimentálně používaného RNA substrátu odvozeného od *XBPI* mRNA. Místo sestřihu je vyznačeno černým trojúhelníkem. D – predikce sekundární struktury antikodonové smyčky tRNA pro fenylalanin, která je rozeznávána jako substrát Ire1 *in vitro*. Místo sestřihu je vyznačeno černým trojúhelníkem. Predikce C a D jsou převzaty z Korennykh et al. (2011).

Gen *HAC1* je transkribován v mRNA s otevřeným čtecím rámcem, který je přerušen 252 nukleotidů dlouhým intronem (v pozici 662–913). Tento intron kóduje 10 aminokyselinových zbytků a poté následuje stop kodon (UGA). Vystřížením intronu dojde ke změně čtecího rámce a k nahrazení

10 aminokyselinových zbytků na C-konci za 18 jiných, které jsou kódovány exonem II. Takto vzniklá mRNA je poté translatována na protein Hac1 (238 aminokyselinových zbytků). Principiálně by i nesestřižená verze *HAC1* mRNA mohla dát vzniknout proteinu (o délce 230 aminokyselinových zbytků), který by byl funkčním transkripčním faktorem. *In vivo* k tomu však nedochází. Translaci nesestřižené *HAC1* mRNA brání samotná sekundární struktura této RNA. Intron má ve své sekvenci G bohatý úsek komplementární k 5' nepřekládané oblasti (UTR, z angl. untranslated region). Tento G bohatý úsek tvoří 19 nukleotidů, z nichž 16 může párovat s 5' UTR (viz Obr. 6). Neúplné párování zřejmě umožňuje disociaci intronu pryč z 5' UTR po jeho vystřížení. Nesestřižená *HAC1* mRNA asociuje s ribozomy či polyzomy, ale není aktivně translatována, což je zřejmě důvod, proč *in vivo* nevzniká protein Hac1 z nesestřižené *HAC1* mRNA. Je však možné, že malá frakce nesestřižené *HAC1* mRNA translatována je. C-konec proteinu Hac1 obsahuje oblast (aminokyselinové zbytky 119–230), která může být polyubiquitinylována. Tak je zřejmě regulována koncentrace proteinu Hac1 v buňkách, a je tak také zabráněno případné akumulaci proteinu Hac1 z nesestřižené mRNA. Delece genu *HAC1* vede stejně jako delece genu *IRE1* k auxotrofii na inositol (Mori et al., 1996; Cox a Walter, 1996; Rügsegger et al., 2001).

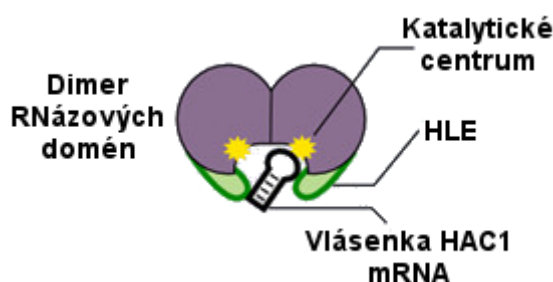


Obr. 6: Model sekundární struktury *HAC1* mRNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

HAC1 mRNA má složitou a z hlediska funkce velmi důležitou sekundární strukturu. 5' a 3' konce intronu vytváří dvě vlásenky se smyčkou na konci, které jsou rozeznávány a ve smyčkách rozstříženy proteinem Ire1. G bohatý úsek intronu páruje s 5' UTR, a brání tak translaci, avšak ribozomy nasedat mohou (v obrázku šedou barvou). Po vystřížení intronu jsou oba exony spojeny ligázou Rlg1 a ribozomy dokončí translaci. Převzato z Aragón et al. (2009).

Za vystřížení intronu z *HAC1* mRNA je zodpovědný protein Ire1, a celý proces je tak nezávislý na spliceozomu. Pokud je vlivem stresu v ER aktivován Ire1 (viz výše), jeho endonukleázová doména specificky štěpí *HAC1* mRNA v rozhraní exon-intron a intron-exon. V místě sestřihu je guanosinový zbytek, který je nezbytný pro správný sestřih. Štěpení na 5' a 3' koncích intronu jsou na sobě nezávislá a mohou probíhat v libovolném pořadí. Základní funkční jednotkou oligomeru Ire1 je homodimer Ire1, který má 2 katalytická centra (každý monomer jedno) a 2 elementy s topologií šroubovice a smyčky (HLE, z angl. helix loop element), které se podílejí na rozpoznání a vazbě substrátu (*HAC1* mRNA). Oligomerizace Ire1 stabilizuje jinak dynamický HLE, a vytvoří tak vhodnou konformaci pro rozeznání a vazbu substrátu. Na rozeznání a vazbě vlásenky *HAC1* mRNA se podílejí HLE z obou jednotek dimeru

Ire1, vlastní sestřih vlásenky však zajišťuje katalytické centrum pouze jednoho monomeru – jeden dimer tedy sestřihuje v dané chvíli jen jednu vlásenku (viz Obr. 7). Pro RNázovou aktivitu jsou klíčové aminokyselinové zbytky 1 061 (histidin) a 1 043 (tyrosin). Zajímavé je, že pro aktivaci RNázové domény není nutná transautofosforylace, ale pouze vazba kofaktoru (ATP či ADP), která způsobí konformační změnu, a tím i aktivaci endonukleázy, která pro svoji funkci nevyžaduje dvojmočné ionty (*Shamu a Walter, 1996; Sidrauski a Walter, 1997; Korennykh et al., 2009; Chawla et al., 2011; Korennykh et al., 2011*).



Obr. 7: Model dimeru RNázových domén proteinu Ire1 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerizace Ire1 stabilizuje HLE (angl. helix loop element), který se účastní na rozpoznání a vazbě substrátu – vlásenky na 5' či 3' konci intronu *HAC1* mRNA. Tato vlaseňka je poté ve smyčce na svém vrcholu rozstřižena specifickou endonukleázovou aktivitou katalytického centra jednoho z monomerů Ire1, zatímco druhý monomer se sestřihu neúčastní. Převzato z Korennykh et al. (2011).

In vitro stačí k vytvoření sestřižené *HAC1* mRNA proteiny Ire1 (jako kofaktor jsou nutné adenosinové nukleotidy) a Rlg1. Rlg1 je tRNA ligáza, která je nutná při sestřihu pre-tRNA. *In vivo* je celý proces složitější. Pro správný sestřih je nutná interakce intronu s 5' UTR *HAC1* mRNA, stejně jako přítomnost 3' UTR *HAC1* mRNA. V oblasti 3' UTR *HAC1* mRNA je vlaseňka se smyčkou (podobně jako v místech vystřižení intronu), která obsahuje dva konzervované sekvenční motivy. Tato vlaseňka se smyčkou (spolu s intronovou oblastí) cílí *HAC1* mRNA na oligomery Ire1 a je možné, že ke svému transportu využívá buněčný cytoskelet. Sestřih již existující *HAC1* mRNA zřejmě probíhá v cytoplazmě, a to i v případě, že má na sobě nasedlé polyzomy. S postupem času od indukce UPR se Ire1 díky svojí NLS přesune do buněčného jádra a tam také poté probíhá sestřih nově vzniklé *HAC1* mRNA. Během sestřihu protein Ire1 interaguje s proteinem Ada5 (transkripční koaktivátor, alias Spt20) – bez této interakce k vystřižení intronu nedochází. Oba exony jsou poté spojeny ligázou Rlg1 a sestřižená *HAC1* mRNA může být translatována. Pokud měla na sobě nasedlé ribozomy již před sestřihem, tak tyto dokončí započatou translaci (v tom jim bránila interakce mezi intronem a 5' UTR). Poločas života nesestřižené *HAC1* mRNA je přibližně 25 minut, po sestřižení klesá na přibližně 20 minut. Během 20 minut po indukci stresu v ER tunikamycinem je sestřiženo 50–60 % *HAC1* mRNA a 15 minut po indukci stresu v ER pomocí dithiothreitolu jsou již transkribovány geny aktivované Hac1. Po 10–12 hodinách od indukce tunikamycinem je úroveň sestřihu *HAC1* mRNA stejná jako před indukcí (*Sidrauski et al., 1996; Sidrauski a Walter, 1997; Travers et al., 2000; Welihinda et al., 2000; Bowring a Llewellyn, 2001; Rügsegger et al., 2001; Goffin et al., 2006; Aragón et al., 2009; Chawla et al., 2011*).

Protein Hac1 je transkripční faktor z proteinové rodiny obsahující motiv bazického leucinového zipu, který hraje klíčovou roli v UPR. Má bazickou DNA vazebnou oblast, za kterou následuje motiv leucinového zipu. Nasedá do promotoru genů kódujících proteiny spojené s ER, jako je například *KAR2*, *FKB2* (peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza) či *PDII* (protein disulfid izomeráza), které mají tzv. UPR element (UPRE). Sekvence UPRE je částečně palindromická a není totožná se sekvencí rozeznávanou při transkripci indukované teplotním šokem. UPRE může být v promotoru více než jen jeden, například protein Pdi1 má dva. Pro transkripci indukovanou Hac1 je nutné, aby UPRE měl minimální délku 17 nukleotidů. Hac1 se váže na UPRE a zřejmě funguje jako homodimer, kdy oba monomery jsou spolu propojené přes leucinový zip (*Kohno et al., 1993; Cox a Walter, 1996; Mori et al., 1996*).

Při stresu v ER indukovaném tunikamycinem či dithiothreitem a následné akumulaci nesbalených proteinů v ER dojde ke zvýšení transkripce nejméně 381 genů s otevřenými čtecími rámci. Celý proces je velmi rychlý, ke specifické aktivaci transkripce dojde během 15 minut od vzniku stresu v ER. Geny aktivované UPR kódují proteiny potřebné pro translokaci (např. Sec61, Sbh1 a Sec62), glykosylaci a modifikaci proteinů, chaperony, proteiny ERAD (např. Der1, Hrd1 a Hrd3), proteiny membránového transportu, proteiny metabolismu lipidů a inositolu, proteiny cílící do vakuoly a proteiny buněčné stěny. Buňka tak zřejmě využívá UPR ke snižování koncentrace nesbalených či poškozených proteinů v lumen ER zvýšením koncentrace proteinů pomáhajících jim v zaujímání nativní konformace (chaperony, glykosylační a modifikační proteiny), případně zvýšením rychlosti jejich odstraňování z ER – buď pomocí ERAD nebo zvýšením anterográdního membránového transportu (*Travers et al., 2000*). Část genů, jejichž transkripce je indukována při UPR, je shodná s geny, jejichž delece vede k aktivaci UPR (celkem 399 genů) (*Jonikas et al., 2009*). Ne všechny geny transkribované při UPR jsou tedy využívány pro sbalování proteinů v ER za nestresových podmínek.

Regulace genové exprese v rámci UPR neprobíhá jen na úrovni transkripční, ale i translační a netýká se jen *HAC1* mRNA. Při UPR dojde ke zvýšení translace mRNA kódujících 363 různých proteinů (z toho 196 nemá zatím známou funkci) a současně ke snížení translace mRNA kódujících 270 různých proteinů (130 bez známé funkce). Zvýšení translace se týká např. mRNA pro proteiny Hac1, Der1 (součást ERAD), Ero1 (sbalování proteinů v ER) a Sec66 (translokace proteinů). Naopak mRNA kódující proteiny biogeneze a skládání ribozomů mají translaci snižovanou (*Rüegsegger et al., 2001; Payne et al., 2008*).

Velmi zajímavá je z hlediska UPR také schopnost proteinu Ire1 rozeznávat a štěpit *in vitro* antikodonovou smyčku tRNA pro fenylalanin (viz Obr. 5D). Pokud by byla tRNA pro fenylalanin substrátem pro Ire1 také *in vivo*, umožňovalo by to buňce při stresu v ER snížit translaci jako celek, a tím také omezit vstup nových proteinů do ER. Ač zcela jiný mechanismus, důsledek by byl stejný jako v případě UPR dráhy závislé na proteinu Perk u živočichů (viz kapitola 3.3) (*Korennykh et al., 2011*).

Ve chvíli, kdy je i přes stresové podmínky obnoveno správné sbalování proteinů v ER, je nutné UPR ukončit. Trvalá aktivace UPR totiž vede k buněčné smrti, která je doprovázena rozpadem ER, buněčného jádra, vystavením fosfatidylserinu na cytoplazmatické membráně a fragmentací DNA – tedy

znaky typickými pro programovanou buněčnou smrt. Haynes a kolektiv použili zvýšenou expresi mutované formy vakuolární karboxypeptidázy Y spolu s delecí genu *ERV29* (buňky bez tohoto genu nejsou schopny efektivně odstraňovat nesbalené proteiny přes ERAD). Jejich model událostí vedoucích ke smrti buňky je následující – bez odstraňování přes ERAD se mutovaná karboxypeptidáza Y hromadí v ER, a způsobuje tak stres v ER. Stres v ER vede k aktivaci UPR, která vede ke zvýšení koncentrace proteinů Ero1 a Pdi1 v lumen ER. Tyto dva proteiny se účastní tvorby disulfidických můstků, při které jako vedlejší produkt vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species). Za normálního stavu jsou ROS v buňkách odstraňovány například pomocí glutathionu. Pokud je však UPR aktivována trvale jako v tomto případě, glutathion je rychleji spotřebováván než obnovován a dochází k akumulaci ROS z ER a z mitochondrií, což vede k poškození organel, fragmentaci DNA a buněčné smrti. Pokud mají buňky zároveň delecí genu *IRE1* či *HAC1*, k akumulaci ROS a s tím spojené buněčné smrti u nich nedochází (Haynes et al., 2004).

O spojení stresu v ER, respektive UPR s programovanou buněčnou smrtí (apoptózou) svědčí také nedavný výzkum – Cebulski a kolektiv objevili gen *BXII*, který kóduje protein Bxi1 (homolog Bi-1 u mnohobuněčných) inhibující protein Bax, Bxi1 je tedy protein s antiapoptotickou funkcí. Bxi1 je lokalizován v ER, v 74 % případů v blízkosti proteinu Sec63. Buňky s delecí *BXII* rostou za normálních podmínek stejnou rychlostí a mají stejně velké kolonie jako buňky s genem *BXII*. Jsou však citlivější k teplotnímu šoku a k uměle vyvolané apoptóze. Buňky s delecí *BXII* jsou také citlivější ke stresu v ER vyvolanému β -mercaptoethanolem či tunikamycinem a mají sníženou UPR i signalizaci přes vápenaté ionty (Cebulski et al., 2011).

Mechanismus, jakým je UPR ukončena, není zcela jasný, jisté je jen to, že důležitou roli hraje stupeň fosforylace Ire1 (Welihinda et al., 1998; Guo a Polymenis, 2006; Rubio et al., 2011). Jednou možností je, že fosforylovaný protein Ire1 (aktivní) je defosforylován fosfatázou, což vede k inaktivaci UPR. Gen *PTC2* (neesenciální) kóduje protein Ptc2 dlouhý 464 aminokyselinových zbytků, který je podobný Pp2c fosfatázám a sám je také serin/threonin fosfatázou. Ptc2 *in vitro* rozpoznává Ire1 a oblastí mezi aminokyselinovými zbytky 174–355 se za přítomnosti hořčičných iontů váže selektivně na fosforylovaný Ire1. Lze předpokládat, že Ptc2 je negativním regulátorem UPR, protože při delecí *PTC2* je deregulován sestřih *HAC1* mRNA a dochází k sestřihu i bez indukce stresu v ER. Delece *PTC2* tedy vede k 3–4× zvýšení UPR, zatímco zvýšená exprese *PTC2* inhibuje buněčný růst. Protože však gen *PTC2* není esenciální, lze předpokládat, že UPR musí být regulována i jinými proteiny, např. proteinem Dcr2, což je rovněž protein fosfatáza. Dcr2 fyzicky interaguje s Ire1 *in vivo*, je-li Ire1 fosforylován na serinových zbytcích (840 a 841). Zvýšená exprese genu *DCR2* brání sestřihu *HAC1* mRNA. Ztráta Dcr2 však pouze slabě zvyšuje citlivost buněk ke stresu v ER. Současná delece genů *DCR2* a *PTC1* (protein fosfatáza typu 2C) však výrazně snižuje životnost buněk. Lze tedy předpokládat, že defosforylace Ire1 se podílí na inaktivaci UPR a tuto úlohu má více různých proteinů (Welihinda et al., 1998; Guo a Polymenis, 2006).

Druhou možností je, že za inaktivaci Ire1, a tím i ukončení UPR, je zodpovědná sama kinázová doména Ire1. Problémem je, že funkce kinázové domény není ani dnes zcela jasná (Rubio et al., 2011).

Záměna části sekvence kinázové domény proteinu Ire1 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sekvencí z kvasinky jiného druhu (např. *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pachysolen tannophilus* či *Torulaspora delbrueckii*) vede ke vzniku a produkci chimérického proteinu, který však vykazuje různou katalytickou aktivitu v závislosti na tom, z jakého druhu pochází, ale také v závislosti na použitém induktoru stresu v ER (Poonthong *et al.*, 2010). Jisté je jen to, že v rámci kinázové domény můžeme rozlišit 2 funkce – kinázová doména je zodpovědná za vazbu kofaktoru (ATP či ADP) a také za kinázovou aktivitu, tedy schopnost přenášet fosfátový zbytek (transautofosforylační aktivita). Obě tyto funkce kinázové domény lze od sebe oddělit. Vazba kofaktoru je nezbytná a zároveň dostatečná pro konformační změnu a s ní spojenou aktivaci RNázové aktivity Ire1. Jaký je však přesný význam transautofosforylační aktivity není jasné, protože i bez ní je Ire1 funkční, přestože má *in vivo* sníženou aktivitu (Korennykh *et al.*, 2009; Poonthong *et al.*, 2010; Chawla *et al.*, 2011; Korennykh *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2011).

Pokud je inaktivována kinázová doména Ire1, respektive mutací je znemožněna transautofosforylační aktivita (vazba kofaktoru je zachována), snižuje se při přetrvávajícím stresu v ER životnost buněk. Takto mutovaný protein Ire1 zůstává aktivní i ve chvíli, kdy jsou již v ER nastoleny normální podmínky – není tedy schopen deaktivace. Rubio a kolektiv odhalili, že v rámci kinázové domény je vysoce fosforylovaná smyčka (HPL, z angl. hyper-phosphorylated loop; aminokyselinové zbytky 864–892), která je zřejmě jedním z faktorů regulujících inaktivaci Ire1. Vysoký stupeň fosforylace HPL by mohl způsobovat destabilizaci oligomerů Ire1, a tím napomáhat k jejich inaktivaci. Protože delece HPL nevede k trvalé aktivaci UPR a nemá ani zcela stejný fenotyp jako mutace inaktivující transautofosforylační aktivitu, existuje zřejmě další mechanismus či mechanismy (Rubio *et al.*, 2011). Je tedy možné, že obě možnosti (defosforylace fosfatázami i zvýšená fosforylace transautofosforylací) jsou správné a teprve jejich kombinací dojde k deaktivaci Ire1, respektive celé UPR.

UPR však není aktivována jen prostřednictvím proteinů Ire1 a Hac1. I v buňkách s delecí genu *IRE1* je při indukci stresu v ER tunikamycinem zvýšena exprese genů *KAR2* a *PDII* (Shamu a Walter, 1996). Buňky s delecí genů *IRE1* a *HAC1* jsou schopny aktivovat expresi genů s UPRE, pokud jsou indukovány tunikamycinem, ovšem po delším čase než buňky s oběma geny. I buňky s delecí *IRE1* jsou schopny aktivovat transkripci genů, jako jsou *KAR2*, *LHS1* či *PDII*, ale již ne *EUG1* a *SCJ1* (všechny geny kódují chaperony ER). Jde tedy o mechanismus, který selektivně vybírá jen určité geny, a to zřejmě na základě jejich promotorů. Schröder a kolektiv tento mechanismus nazvali základní promotorovou aktivací (CPA, z angl. core promoter activation) a zjistili, že je spojen se stimulací aktivity holoenzymu RNA polymerázy II stresem v ER, a to nezávisle na Ire1, Hac1 či UPRE. V buňkách je tato dráha ještě dále regulována pomocí proteinu Sin4, který má na CPA inhibiční vliv (Schröder *et al.*, 2003).

Jedním z důsledků stresu v ER a následné UPR je zvýšení syntézy fosfolipidů, které vede k nárůstu ER v buňkách. Dochází k expanzi periferního ER, respektive ke vzniku nových cisteren – to poskytuje dostatek prostoru pro sbalování nově syntetizovaných proteinů (jde tedy hlavně o objem, nikoliv o tvar ER). V buňkách s delecí genů *IRE1* či *HAC1* však k expanzi ER nedochází. Protein Hac1 totiž aktivuje komplex Ino2/4, který reguluje expresi genů zapojených do syntézy lipidů. Pokud má buňka

lipidů dost, je aktivita komplexu Ino2/4 inhibována proteinem Opi1, který se váže na Ino2. Pokud je gen *OPI1* odstraněn, dochází ke zvětšení objemu ER bez zvýšení syntézy chaperonů ER. To znamená, že expanze ER nemusí být vždy závislá na UPR (Travers *et al.*, 2000; Schuck *et al.*, 2009).

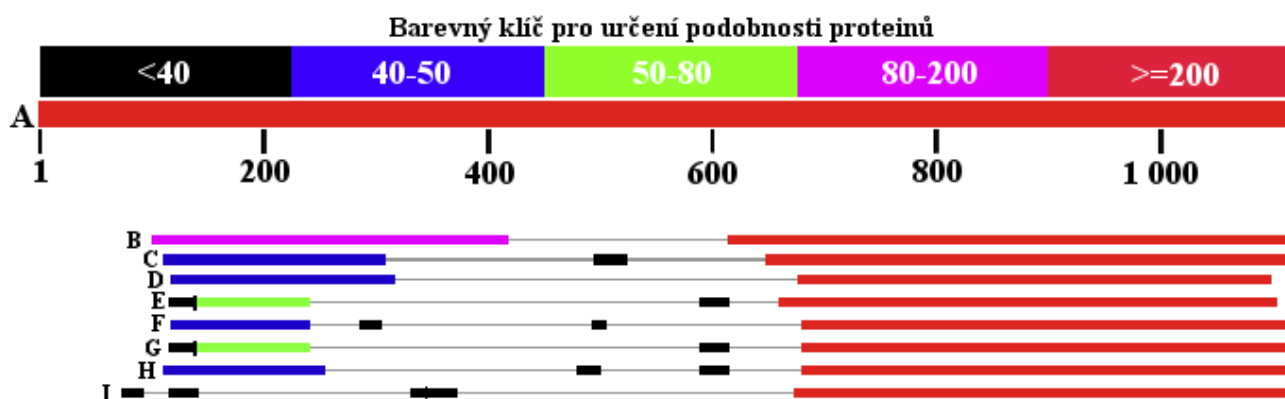
3.3 Buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) u savců

Na rozdíl od kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) u savců mnohem komplexnější a zahrnuje více drah než jen aktivaci transkripce závislou na proteinech Ire1 a Hac1.

U savců, respektive živočichů obecně, je zachována dráha závislá na Ire1, která v mnohém připomíná Ire1 dependentní dráhu u *S. cerevisiae* (viz Obr. 8). Při akumulaci nesbalených proteinů v ER dojde k disociaci BiP z N-koncové luminální domény proteinu Ire1 a k homooligomerizaci Ire1 přes luminální doménu. Následuje autofosforylace, a tím i aktivace oligomerů Ire1. Takto aktivované oligomery Ire1 jsou schopné svojí C-koncovou endonukleázovou doménou vystříhnout intron z *XBPI* mRNA (analog *HAC1* u *S. cerevisiae*). Typická délka intronu v *XBPI* mRNA je pouze 20 až 26 nukleotidů (oproti 252 nukleotidům u *S. cerevisiae*), lidský intron z *XBPI* mRNA má délku 26 nukleotidů (nukleotidy 531-556). Vlásoky na koncích intronu se velmi podobají již dříve popsaným vláskám u *HAC1* mRNA (viz Obr. 5). Nesestřižená *XBPI* mRNA kóduje protein Xbp1 o délce 261 aminokyselinových zbytků. Nesestřižená *XBPI* mRNA je slabě, ale konstitutivně exprimována, vzniklý protein Xbp1 je však velmi rychle degradován v proteazomech. Po vystřížení intronu a následné ligaci dojde k posunu čtecího rámce (podobně jako u *S. cerevisiae*) a výsledný protein má délku 376 aminokyselinových zbytků. Protein Xbp1 vzniklý po vystřížení intronu je transkripční faktor s motivem bazického leucinového zipu (obdoba Hac1 u *S. cerevisiae*), který se váže na oblast zodpovědnou za aktivaci transkripce při stresu v ER (ERSE, z angl. ER stress response element) v promotorech genů transkribovaných při UPR. Oproti *S. cerevisiae* se u savců při UPR mění množství proteinu Ire1. Krátce po aktivaci UPR koncentrace Ire1 v buňkách stoupá, avšak při delší aktivaci UPR množství Ire1 naopak klesá. Díky existenci dalších drah jsou však savčí buňky schopny aktivovat UPR a exprimovat Xbp1 nezávisle na Ire1 (Liu *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001; Calton *et al.*, 2002; shrnutí v Rutkowski a Kaufman, 2004; Yang a Paschen, 2009; Hooks a Griffiths-Jones, 2011; Okuda *et al.*, 2012).

Další UPR dráhou u savců je dráha závislá na Perk. Protein Perk je kináza lokalizovaná v membráně ER, která sdílí mnoho rysů s proteinem Ire1. Aktivace je stejná jako u Ire1 – BiP disociuje z luminální domény Perk a umožní tak jeho homooligomerizaci, autofosforylaci a aktivaci. Perk má podobně jako Ire1 cytoplazmatickou serin/threoninovou kinázovou doménu, mechanismus jejich působení při UPR je však zcela odlišný. Perk svojí kinázovou doménou fosforyluje eukaryotní iniciační faktor 2 α (eIF2 α), což brání vzniku ternárního komplexu eIF2-GTP-tRNA^{methionin}. Tímto způsobem je zablokována translace ještě před rozpoznáním iniciačního kodónu a vazbou velké podjednotky ribozomu a dochází k rozpadu polyribosomů (shrnutí v Rutkowski a Kaufman, 2004 a Yang a Paschen, 2009).

Kvasinka *S. cerevisiae* nemá gen *PERK*, a tedy ani tuto dráhu, ačkoliv podobnou funkci by mohl mít sestřih antikodonové smyčky tRNA pro fenylalanin proteinem Ire1, pokud k němu *in vivo* skutečně dochází. Zajímavá je také podobnost luminální domény proteinů Ire1 a Perk. Liu a kolektiv nahradili luminální doménu proteinu Ire1 kvasinky *S. cerevisiae* luminální doménou proteinu Perk hád'átka *Caenorhabditis elegans* a tento chimérický protein byl schopný aktivovat UPR v buňkách kvasinek bez normálního proteinu Ire1 (Liu et al., 2000; Korennykh et al., 2011).

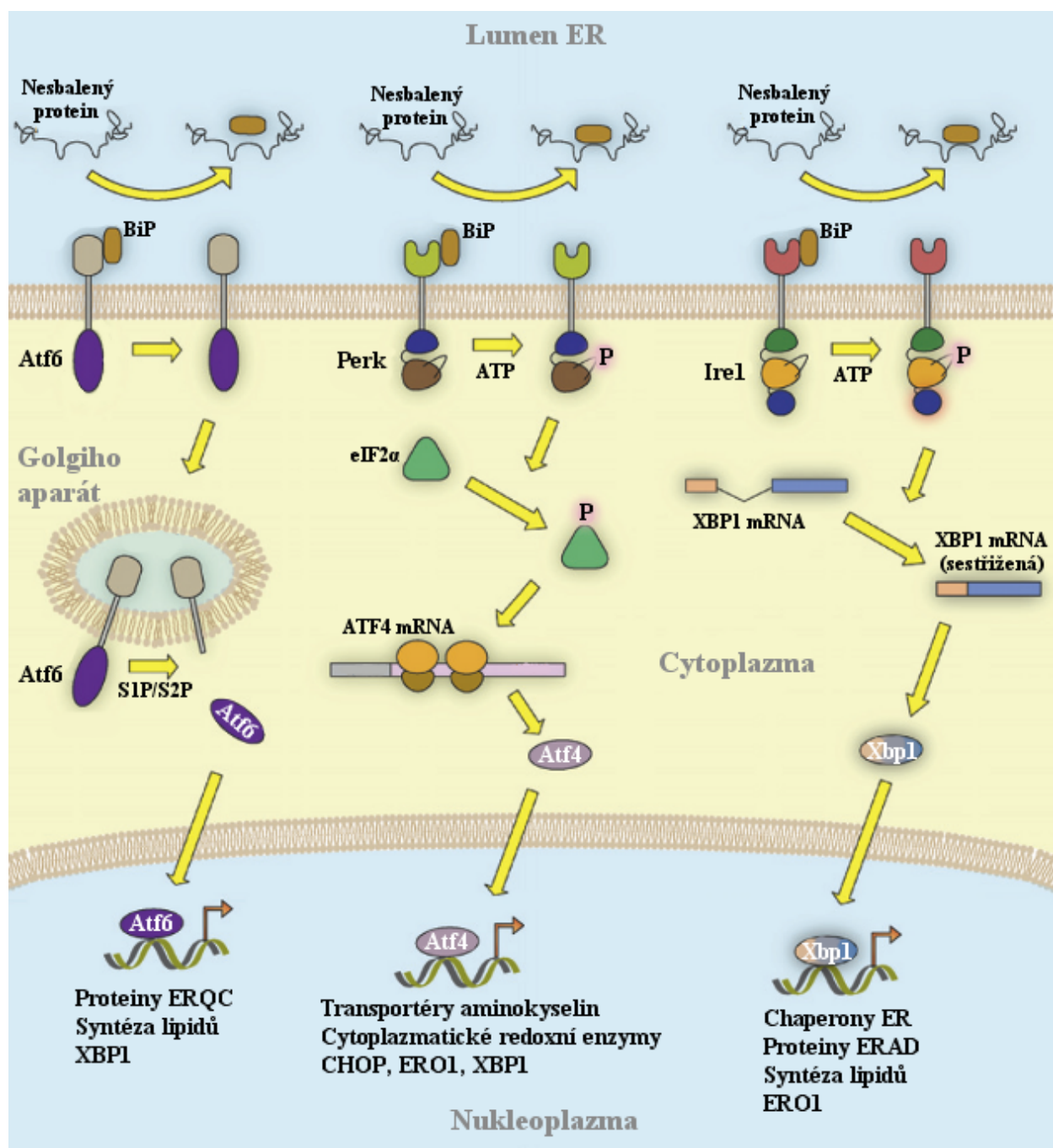


Obr. 8: Srovnání aminokyselinové sekvence proteinu Ire1 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s aminokyselinovými sekvencemi proteinů Ire1 z jiných organismů.

A – Ire1 (*Saccharomyces cerevisiae* S288c, 1 115); B – pravděpodobný Ire1 (*Candida albicans* SC5314, 1 224); C – Ire1, izoforma A (*Caenorhabditis elegans*, 967); D – Ire1, izoforma B (*Drosophila melanogaster*, 1 074); E – Ire1 α , prekursor (*Mus musculus*, 977); F – Ire1 β , prekursor (*Mus musculus*, 911); G – Ire1 α , prekursor (*Homo sapiens*, 977); H – Ire1 β (*Homo sapiens*, 974) a I – Ire1-1 (*Arabidopsis thaliana*, 887). V závorce je vždy uveden latinský název organismu z něhož protein pochází a délka proteinu v aminokyselinových zbytcích. Ze srovnání je patrné, že C-koncová část proteinu Ire1 *S. cerevisiae* je dobře konzervována jak u živočichů, tak u hub a rostlin. Je to logické, protože v této části jsou kinázová a endonukleázová doména, tedy domény nezbytné pro funkci proteinu Ire1. Kromě těchto domén je také konzervována oblast v N-koncové části (aminokyselinové zbytky cca 100–250). V této oblasti má protein Ire1 *S. cerevisiae* subdoménu zodpovědnou za vazbu a disociaci Kar2 (alias BiP), a také za oligomerizaci Ire1 (viz Obr. 3). Primární sekvence proteinů jsou z databáze NCBI (dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>). Vytvořeno v NCBI BLAST (2012).

Poslední UPR dráhou u savců je Atf6 dependentní dráha. Protein Atf6 je v membráně ER zadržován navázaným proteinem BiP. Po disociaci BiP z Atf6 (při stresu v ER), putuje Atf6 sekreční dráhou do Golgiho aparátu, kde je proteolyticky štěpen proteázami S1P a S2P. Volná (odštěpená) cytoplazmatická doména je aktivním transkripčním faktorem (shrnutí v Rutkowski a Kaufman, 2004).

Po aktivaci UPR protein Perk fosforylací eIF2 α zastaví obecnou translaci, avšak umožní tak specifickou translaci *ATF4* mRNA. Než je dokončena syntéza proteinu Atf4, protein Atf6 je proteolyticky rozštěpen a aktivuje transkripci genů pro chaperony ER a *XBPI*. Tím vzniká dostatek substrátu pro Ire1, který sestřihuje *XBPI* mRNA. Atf4 zatím spustí transkripci Atf4 závislých genů pro proteiny redoxní rovnováhy, syntézy disulfidických můstků a protein Chop, který je transkripčním faktorem vedoucím buňku k apoptóze. Xbp1 nasedá do promotoru genů kódujících proteiny ERAD, syntézy lipidů a chaperony ER a indukuje jejich transkripci – viz Obr. 9 (shrnutí v Rutkowski a Kaufman, 2004).



Obr. 9: Model UPR drah u savců.

Všechny UPR dráhy začínají aktivací v ER disociací proteinu BiP z luminální domény proteinů Atf6, Perk či Ire1. Protein Atf6 poté putuje do Golgiho aparátu, kde je proteolyticky štěpen a jeho cytoplasmatická doména putuje do jádra, kde aktivuje transkripci genů kódujících proteiny ERQC, proteiny syntézy lipidů a Xbp1. Kináza Perk se po aktivaci autofosforyluje a následně fosforyluje eIF2α, což vede k obecnému zastavení translace, avšak umožní tak translaci *ATF4* mRNA. Protein Atf4 poté v jádře aktivuje expresi genů pro transportéry aminokyselin, cytoplasmatické redoxní enzymy, Ero1, Xbp1 a Chop – proapoptotický protein. Protein Ire1 se po disociaci BiP autofosforyluje, a tím aktivuje endonukléazovou doménu. Ta následně odstraní intron z *XBPI* mRNA, která po ligaci dá vzniknout proteinu Xbp1. Tento transkripční faktor aktivuje translaci genů kódujících chaperony ER, protein Ero1 a proteiny zapojené v ERAD či syntéze lipidů. Převzato z Lee a Sicheri (2011).

3.4 Metody studia stresu v endoplazmatickém retikulu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Velikost, tvar a distribuce ER odráží fyziologický stav buňky – např. při stresu v ER dochází ke vzniku nových cisteren ER. Ke studiu ER se tedy často používá fluorescenční značení ER a světelná či konfokální mikroskopie (*Terasaki et al., 1998; Travers et al., 2000, Schuck et al., 2009*). Starší, ale stále využívanou metodou je barvení ER pomocí dicarbocyaninové barvy DiOC₆. Je to zeleně fluoreskující, pozitivně nabitá lipofilní molekula, která může procházet přes cytoplazmatickou membránu. Při nízké koncentraci se akumuluje v mitochondriích, při vyšší koncentraci barví ER. Výhody této metody jsou její jednoduchost a silná fluorescence – poskytuje vyšší kvalitu obrazu než imunofluorescenční barvení. Lze barvit fixované i živé buňky (používá se koncentrace 2,5 µg/ml, respektive 0,5–1 µg/ml). Příprava preparátu (fixace a následné barvení) je velmi rychlá – přibližně 15 minut. Nevýhodou je nespecifičnost barvení – kromě ER barví DiOC₆ také mitochondrie, Golgiho aparát či endozomy. Otázkou také je, zda při barvení živých buněk nedochází k fyziologickým změnám způsobeným akumulací DiOC₆ v mitochondriích (*shrnutí a podrobné protokoly v Terasaki et al., 1998*).

Pro vyšší specifitu fluorescenčního značení (oproti DiOC₆) se používají chimérní proteiny – proteiny lokalizované do ER, které mají na svém N- či C-konci napojený zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. green fluorescent protein). Musí jít o proteiny, které jsou v buňce zastoupeny ve větším množství, aby byl získaný signál dostatečně silný. Pro trvalou expresi těchto chimérních proteinů je nutné, aby byl jejich kódující úsek začleněn do genomu, v ideálním případě aby nahradil původní gen kódující neznačený protein. Často se používá značený Sec61-GFP (GFP je na C-konci), případně Sec63-GFP (*Prinz et al., 2000; Wiederkehr et al., 2003*).

Prinz a kolektiv použili ke značení ER fúzní protein ss-GFP-HDEL. Signální sekvence, která lokalizuje GFP do ER, pochází z karboxypeptidázy Y. Na C-konci je sekvence HDEL (retenční signál udržující protein v ER). Indukovatelnou expresi zajistili pomocí *MET25* promotoru (*Prinz et al., 2000*).

Jistou nevýhodou fluorescenčního značení proteinů může být jejich preferenční lokalizace do určitých domén či subdomén ER související s jejich funkcí či osudem (sekrece, degradace a atd.), a tím snížená schopnost vizualizace ER jako celku (viz kapitoly 2.2 až 2.4).

Experimentálně užívané metody pro indukci stresu v ER včetně koncentrací induktorů používaných u kvasinky *S. cerevisiae* jsou uvedeny v kapitole 3.1.

Indukci stresu v ER, respektive aktivaci UPR lze studovat pomocí přímých a nepřímých metod. Přímé metody jsou zaměřeny na detekci sestřihu *HAC1* mRNA, zatímco nepřímé metody sledují expresi genů, které jsou více exprimovány při UPR. Mezi tyto geny patří: *DER1*, *ERO1*, *EUG1*, *FKB2*, *INO1*, *LHS1*, *KAR2*, *PDII* či *YDJ1*. Úroveň jejich exprese je vyhodnocována oproti kontrole pomocí microarray analýzy (*Travers et al., 2000; Rubio et al., 2011*).

Jiný typ nepřímých metod využívá k detekci exprese reportérového genu pod kontrolou UPRE. Starší verze této metody je založena na reportérovém konstruktu UPRE-lacZ (*Cox et al., 1993*). Pollard a kolektiv ve své novější verzi této metody použili k vizualizaci protein GFP. Výhodou této verze je, že není třeba přidávat žádný substrát (např. X-Gal). Před genem pro GFP jsou čtyři UPRE z *KAR2* a celý

tento konstrukt je integrován do genomové DNA do lokusu *URA3* (kazeta připravena pomocí PCR z vektoru pKT007). Buňky tedy mají jednu alelu *URA3* nahrazenou reportérovým konstruktem 4xUPRE-GFP (Pollard *et al.*, 1998).

Pro přímou detekci sestřihu *HAC1* mRNA se dříve používala hlavně Northernblot analýza. Sestřižená a nesestřižená forma se liší svojí velikostí (nesestřižená forma má délku 1 449 nukleotidů, sestřižená 1 197 nukleotidů) a odliší se tak na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti molekul (Bonilla *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2011).

Novější metodou pro detekci sestřihu je reverzní transkripce následovaná PCR amplifikací (RT-PCR). Molekuly mRNA jsou nejprve přepsány na cDNA a poté je provedena amplifikace fragmentu vymezeného specifickými primery. Poonthong a kolektiv použili pro detekci sestřižené a nesestřižené *HAC1* cDNA primery ohraničující oblast intronu: GCCCAAGAGTATGCCGATTCCG a ACCCTCGAGCGATTGTCTTCATG (Poonthong *et al.*, 2010).

Zajímavou metodou pro detekci sestřihu *HAC1* mRNA je jeho přímá vizualizace pomocí sestřihového reportéru. Část exonu I genu *HAC1* (báze 1 až 648) je nahrazena ORF pro GFP (viz Obr. 6, vyznačeno zelenou barvou) a tímto konstruktem je nahrazena jedna alela genu *HAC1*. Při aktivaci UPR dojde k vystřižení intronu z *HAC1* mRNA (ten funguje jako represor translace) a k translaci GFP (Aragón *et al.*, 2009).

Při studiu stresu v ER, respektive UPR, se také využívá studium lokalizace *HAC1* mRNA, která se mění po aktivaci UPR. Aragón a kolektiv použili konstrukt, ve kterém ke 3' UTR genu *HAC1* připojili 16 tandemových repetitivních vazebných sekvencí proteinu U1A. K vizualizaci fúzní *HAC1* mRNA využili U1A-GFP, který byl v daných buňkách koexprimován (Aragón *et al.*, 2009).

4. Závěr

Z výsledků mé literární rešerše vyplývá, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je použitelná jako modelový organismus pro studium stresu v ER a UPR u savců, avšak s jistými omezeními. Její ER má stejné členění a morfologie je udržována podobnými mechanismy jako v případě savců. Distribuce ER a jeho změny v průběhu buněčného cyklu jsou však odlišné a uplatňuje se zcela jiný typ cytoskeletu (aktin místo mikrotubulů) (viz kapitoly 2.2–2.4).

Metody používané pro indukci stresu v ER jsou mnohdy stejné pro *S. cerevisiae* i savce. Nevýhodou *S. cerevisiae* je, že při stresu v ER se často objevuje také stres v buněčné stěně a naopak, zatímco savci žádnou buněčnou stěnu nemají.

Kvasinka *S. cerevisiae* je i přes vyšší komplexitu UPR drah u savců vhodná jako modelový organismus pro studium aktivace a průběhu UPR savců včetně člověka. Dráha závislá na Ire1, která je jedinou dráhou UPR u kvasinky, je vysoce konzervována i u živočichů. Kromě kinázové a endonukleázové domény sdílí kvasinkové i savčí proteiny Ire1 také N-koncovou oblast, která je zodpovědná za vazbu proteinu Kar2 (BiP) a za aktivaci Ire1 dependentní dráhy (viz Obr. 8). Luminální doména proteinu Ire1 je zaměnitelná za luminální doménu proteinu Perk, což ještě rozšiřuje možnosti využití kvasinek jako modelového organismu. Rovněž je velmi pravděpodobné, že protein Ire1 má (vzhledem ke své evoluční konzervovanosti) u savců podobně jako u kvasinky vliv na genomovou stabilitu.

Pokud je stres v ER u savců dlouhodobý a buňce se i navzdory aktivaci UPR nedaří nastolit homeostázi, aktivuje dráhy vedoucí k programované buněčné smrti (apoptóze), například pomocí proteinu Chop, který je jedním z cílů transkripční aktivace Atf4 dependentní dráhy. U kvasinky *S. cerevisiae* byl fenomén apoptózy indukované stresem v ER objeven teprve nedávno a jeho přesný mechanismus není jasný. Přesto je velmi pravděpodobné, že i zde se najdou shodné rysy mezi kvasinkou a savci, například v podobě homologních proteinů či celých drah.

V posledních letech přibývá studií, které ukazují na souvislost mezi stresem v ER, potažmo UPR a vznikem či rozvojem onemocnění, jako jsou cukrovka, žloutenka typu C, prionová onemocnění, mozková traumata a mnoho chorob postihujících nervovou soustavu, jako jsou např. Parkinsonova, Huntingtonova či Alzheimerova choroba. Můžeme s jistotou prohlásit, že s přibývajícími studiemi bude přibývat také onemocnění, u kterých bude prokázána souvislost se stresem v ER či UPR. V nádorových buňkách je vlivem nedostatečného zásobování kyslíkem a živinami často indukován stres v ER a nádorové buňky tyto podmínky přežívají díky dlouhodobé aktivaci UPR. Zajímavé je, že dráhy UPR jsou u savců aktivovány také zcela fyziologicky při buněčných diferenciacích. Některé ontogenetické poruchy by tedy mohly být vysvětleny narušením UPR. Důkladné studium aktivace jednotlivých drah UPR je proto klíčové a jeho výsledky mohou posloužit při vývoji nových protinádorových terapií či léků proti zmíněným nervovým chorobám a vývojovým poruchám. Jako modelový organismus základního výzkumu může sloužit právě kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* – se všemi výhodami i omezeními.

5. Seznam užité literatury

- Anderson, D.J., and Hetzer, M.W. (2007). Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology* 9, 1160-1166.
- Aragon, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korennykh, A.V., Rubio, C.A., and Walter, P. (2009). Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* 457, 736-U739.
- Back, S.H., Schroder, M., Lee, K., Zhang, K.Z., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* 35, 395-416.
- Becker, F., Block-Alper, L., Nakamura, G., Harada, J., Wittrup, K.D., and Meyer, D.I. (1999). Expression of the 180-kD ribosome receptor induces membrane proliferation and increased secretory activity in yeast. *Journal of Cell Biology* 146, 273-284.
- Benali-Furet, N.L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R., *et al.* (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 24, 4921-4933.
- Bicknell, A.A., Babour, A., Federovitch, C.M., and Niwa, M. (2007). A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *Journal of Cell Biology* 177, 1017-1027.
- Bifulco, G., Miele, C., Di Jeso, B., Beguinot, F., Nappi, C., Di Carlo, C., Capuozzo, S., Terrazzano, G., Insabato, L., and Ulianich, L. (2012). Endoplasmic reticulum stress is activated in endometrial adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology* 125, 220-225.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H.S., Karmon, S., Royes, P., and Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to cytoskeleton-based segregation machinery. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4618-4627.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4296-4305.
- Bonilla, M., Nastase, K.K., and Cunningham, K.W. (2002). Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *Embo Journal* 21, 2343-2353.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, J.M. (1997). Genetics - Yeast as a model organism. *Science* 277, 1259-1260.
- Bowring, C.E., and Llewellyn, D.H. (2001). Differences in HAC1 mRNA processing and translation between yeast and mammalian cells indicate divergence of the eukaryotic ER stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 789-800.
- Calfon, M., Zeng, H.Q., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126, 361-373.
- Cebulski, J., Malouin, J., Pinches, N., Cascio, V., and Austriaco, N. (2011). Yeast Bax Inhibitor, Bxi1p, Is an ER-Localized Protein That Links the Unfolded Protein Response and Programmed Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* 6.
- Chawla, A., Chakrabarti, S., Ghosh, G., and Niwa, M. (2011). Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase. *Journal of Cell Biology* 193, 41-50.
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I., and Helenius, A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein-synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6229-6233.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein-kinase. *Cell* 73, 1197-1206.
- Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87, 391-404.
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology* 174, 915-921.
- Dacks, J.B., and Field, M.C. (2007). Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *Journal of Cell Science* 120, 2977-2985.

- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A.G., Tian, X., Onoe, T., Qian, Q., Li, A.R., Cai, Y.Q., Kamath, P.S., King, B.F., *et al.* (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genetics* 36, 575-577.
- Dawson, T.R., Lazarus, M.D., Hetzer, M.W., and Wenthe, S.R. (2009). ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation. *Journal of Cell Biology* 184, 659-675.
- Dejgaard, K., Theberge, J.F., Heath-Engel, H., Chevet, E., Tremblay, M.L., and Thomas, D.Y. (2010). Organization of the Sec61 Translocon, Studied by High Resolution Native Electrophoresis. *Journal of Proteome Research* 9, 1763-1771.
- Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. (2006). A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126, 349-359.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and Schekman, R. (1991). Assembly of yeast SEC proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808.
- Deshaies, R.J., and Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic-reticulum. *Journal of Cell Biology* 105, 633-645.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H., and Hucho, F. (2001). Nuclear envelope proteomics: Novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11943-11948.
- Firtina, Z., and Duncan, M.K. (2011). Unfolded Protein Response (UPR) is activated during normal lens development. *Gene Expression Patterns* 11, 135-143.
- Fuerst, J.A., and Webb, R.I. (1991). Membrane-bounded nucleoid in the eubacterium *Gemmata-obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8184-8188.
- Gardarin, A., Chedin, S., Lagniel, G., Aude, J.C., Godat, E., Catty, P., and Labarre, J. (2010). Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Molecular Microbiology* 76, 1034-1048.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* 333, 1891-1894.
- Gass, J.N., Gifford, N.M., and Brewer, J.W. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49047-49054.
- Gilmore, R., Walter, P., and Blobel, G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic-reticulum. 2. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *Journal of Cell Biology* 95, 470-477.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546-&.
- Goffin, L., Vodala, S., Fraser, C., Ryan, J., Timms, M., Meusburger, S., Catimel, B., Nice, E.C., Silver, P.A., Xiao, C.Y., *et al.* (2006). The unfolded protein response transducer Ire1p contains a nuclear localization sequence recognized by multiple beta importins. *Molecular Biology of the Cell* 17, 5309-5323.
- Guo, J., and Polymenis, M. (2006). Dcr2 targets Ire1 and downregulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Reports* 7, 1124-1127.
- Gupta, R.S., and Golding, G.B. (1996). The origin of the eukaryotic cell. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 166-171.
- Gupton, S.L., Collings, D.A., and Allen, N.S. (2006). Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 95-105.
- Hales, C.N., Luzio, J.P., Chandler, J.A., and Herman, L. (1974). Localization of calcium in smooth endoplasmic-reticulum of rat isolated fat-cells. *Journal of Cell Science* 15, 1-15.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Haynes, C.M., Titus, E.A., and Cooper, A.A. (2004). Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Molecular Cell* 15, 767-776.
- Henry, K.A., Blank, H.M., Hoose, S.A., and Polymenis, M. (2010). The Unfolded Protein Response Is Not Necessary for the G1/S Transition, but It Is Required for Chromosome Maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* 5.
- Herskovits, A.A., Shimoni, E., Minsky, A., and Bibi, E. (2002). Accumulation of endoplasmic membranes and novel membrane-bound ribosome-signal recognition particle receptor complexes in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Biology* 159, 403-410.

- Hooks, K.B., and Griffiths-Jones, S. (2011). Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron. *Rna Biology* 8, 552-556.
- Hu, J.J., Shibata, Y., Zhu, P.P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., and Blackstone, C. (2009). A Class of Dynamin-like GTPases Involved in the Generation of the Tubular ER Network. *Cell* 138, 549-561.
- Ji, C., and Kaplowitz, N. (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 124, 1488-1499.
- Jonikas, M.C., Collins, S.R., Denic, V., Oh, E., Quan, E.M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J.S., *et al.* (2009). Comprehensive Characterization of Genes Required for Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 323, 1693-1697.
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S.V., Ehrlich, R., and Lederkremer, G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 12, 1711-1723.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *Plos One* 6.
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire 1. *Journal of Cell Biology* 167, 445-456.
- Klopfenstein, D.R.C., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *Embo Journal* 17, 6168-6177.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., and Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic-reticulum. *Molecular and Cellular Biology* 13, 877-890.
- Korennykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 457, 687-U682.
- Korennykh, A.V., Korostelev, A.A., Egea, P.F., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Zhang, C., Shokat, K.M., and Walter, P. (2011). Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *Bmc Biology* 9.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* 325, 477-481.
- Lane, N.J. (1969). Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *Journal of Cell Biology* 40, 286-&.
- Lee, K.P.K., and Sicheri, F. (2011). Principles of IRE1 modulation using chemical tools. In *Methods in Enzymology: Unfolded Protein Response and Cellular Stress*, Vol 490, Pt B, P.M. Conn, ed., pp. 271-294.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., and Fuerst, J.A. (1997). Pirellulosomes: A new type of membrane-bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*. *Microbiology-Uk* 143, 739-748.
- Lingappa, V.R., Devillersthiery, A., and Blobel, G. (1977). Nascent pre-hormones are intermediates in biosynthesis of authentic bovine pituitary growth-hormone and prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 2432-2436.
- Liu, C.Y., Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2000). Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24881-24885.
- Liu, F., Inageda, K., Nishitai, G., and Matsuoka, M. (2006). Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Environmental Health Perspectives* 114, 859-864.
- Lloyd, D.J., Wheeler, M.C., and Gekakis, N. (2010). A Point Mutation in Sec61 alpha 1 Leads to Diabetes and Hepatosteatosis in Mice. *Diabetes* 59, 460-470.
- Lu, Z.M., Zhou, L., Killela, P., Rasheed, A.B., Di, C.H., Poe, W.E., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Nicchitta, C., and Yan, H. (2009). Glioblastoma Proto-oncogene SEC61 gamma Is Required for Tumor Cell Survival and Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Research* 69, 9105-9111.
- Lynes, E.M., and Simmen, T. (2011). Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): How diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1813, 1893-1905.
- McKibbin, C., Mares, A., Piacenti, M., Williams, H., Roboti, P., Puumalainen, M., Callan, A.C., Lesiak-Mieczkowska, K., Linder, S., Harant, H., *et al.* (2012). Inhibition of protein translocation at the endoplasmic reticulum promotes activation of the unfolded protein response. *Biochemical Journal* 442, 639-648.

- Mera, K., Kawahara, K., Tada, K., Kawai, K., Hashiguchi, T., Maruyama, I., and Kanekura, T. (2010). ER signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 350-354.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., and Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: Transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells* 1, 803-817.
- Mori, K., Ma, W.Z., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1993). A transmembrane protein with a Cdc2+/Cdc28-related kinase-activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743-756.
- Mori, Y., Sato, F., Selaru, F.M., Olaru, A., Perry, K., Kimos, M.C., Tamura, G., Matsubara, N., Wang, S.N., Xu, Y., *et al.* (2002). Instabilitytyping reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers. *Cancer Research* 62, 3641-3645.
- Mori, Y., Yin, J., Rashid, A., Leggett, B.A., Young, J., Simms, L., Kuehl, P.M., Langenberg, P., Meltzer, S.J., and Stine, O.C. (2001). Instabilitytyping: Comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Research* 61, 6046-6049.
- Nikonov, A.V., Hauri, H.P., Luring, B., and Kreibich, G. (2007). Climp-63-mediated binding of microtubules to the ER affects the lateral mobility of translocon complexes. *Journal of Cell Science* 120, 2248-2258.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Ueno, T., Kurata, T., Sata, T., and Irie, S. (2007). p180 is involved in the interaction between the endoplasmic reticulum and microtubules through a novel microtubule-binding and bundling domain. *Molecular Biology of the Cell* 18, 3741-3751.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279, 445-450.
- Okuda, T., Wakaguri, H., Suzuki, Y., and Sugano, S. (2012). Monitoring endoplasmic reticulum stress responsive mRNAs by RNA sequencing. *Gene* 500, 63-72.
- Ortsater, H., and Sjöholm, A. (2007). A busy cell - Endoplasmic reticulum stress in the pancreatic beta-cell. *Molecular and Cellular Endocrinology* 277, 1-5.
- Outinen, P.A., Sood, S.K., Liaw, P.C.Y., Sarge, K.D., Maeda, N., Hirsh, J., Ribau, J., Podor, T.J., Weitz, J.I., and Austin, R.C. (1998). Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochemical Journal* 332, 213-221.
- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W.S., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Karakesisoglou, L. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *Journal of Cell Science* 118, 3419-3430.
- Palade, G.E. (1955). A small particulate componens of the cytoplasm. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1, 59-&.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein-transport in yeast reconstituted with a purifies complex of SEC proteins and KAR2p. *Cell* 81, 561-570.
- Payne, T., Hanfrey, C., Bishop, A.L., Michael, A.J., Avery, S.V., and Archer, D.B. (2008). Transcript-specific translational regulation in the unfolded protein response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Letters* 582, 503-509.
- Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G.N., and Nielsen, J. (2010). Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *Fems Yeast Research* 10, 1046-1059.
- Pollard, M.G., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (1998). Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell* 1, 171-182.
- Poothong, J., Sopha, P., Kaufman, R.J., and Tirasophon, W. (2010). Domain compatibility in Ire1 kinase is critical for the unfolded protein response. *Febs Letters* 584, 3203-3208.
- Porter, K.R., Claude, A., and Fullam, E.F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy - methods and preliminary observations. *Journal of Experimental Medicine* 81, 233-&.
- Porter, K.R., and Kallman, F.L. (1952). Significance of cell particulates as seen by electron microscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 54, 882-891.
- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A., and Rapoport, T.A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 150, 461-474.

- Puhka, M., Vihinen, H., Joensuu, M., and Jokitalo, E. (2007). Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* *179*, 895-909.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., and Huber, H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* *1*, 9-18.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* *280*, 1763-1766.
- Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., and Walter, P. (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *Journal of Cell Biology* *193*, 171-184.
- Ruegsegger, U., Leber, J.H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 103-114.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology* *14*, 20-28.
- Schafer, A., and Wolf, D.H. (2009). Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Embo Journal* *28*, 2874-2884.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T.L., Yates, J.R., and Gerace, L. (2003). Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* *301*, 1380-1382.
- Schroder, M., Clark, R., and Kaufman, R.J. (2003). IRE1- and HAC1-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Molecular Microbiology* *49*, 591-606.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *569*, 29-63.
- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C., and Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *Journal of Cell Biology* *187*, 525-536.
- Scrimale, T., Didone, L., Bentley, K., and Krysan, D.J. (2009). The Unfolded Protein Response Is Induced by the Cell Wall Integrity Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascade and Is Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* *20*, 164-175.
- Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Embo Journal* *15*, 3028-3039.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms Determining the Morphology of the Peripheral ER. *Cell* *143*, 774-788.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., and Rapoport, T.A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell* *126*, 435-439.
- Sidrauski, C., Cox, J.S., and Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *87*, 405-413.
- Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *90*, 1031-1039.
- Sparkes, I., Runions, J., Hawes, C., and Griffing, L. (2009). Movement and Remodeling of the Endoplasmic Reticulum in Nondividing Cells of Tobacco Leaves. *Plant Cell* *21*, 3937-3949.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., and Schekman, R. (1992). Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane-proteins into the endoplasmic-reticulum. *Molecular Biology of the Cell* *3*, 129-142.
- Terasaki, M., Chen, L.B., and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic-reticulum are highly interdependent structures. *Journal of Cell Biology* *103*, 1557-1568.
- Terasaki, M., Loew, L., Lippincott-Schwartz, J., and Zaal, K. (1998). Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria. *Current Protocols in Cell Biology* *4.4.1-4.4.18*.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* *101*, 249-258.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., and Hara-Nishimura, I. (2010). Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 6894-6899.

- Vance, J.E. (1991). Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat-liver mitochondria and endoplasmic-reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 266, 89-97.
- Wakana, Y., Takai, S., Nakajima, K.I., Tani, K., Yamamoto, A., Watson, P., Stephens, D.J., Hauri, H.P., and Tagaya, M. (2008). Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtanuclear compartment related to ER-associated degradation. *Molecular Biology of the Cell* 19, 1825-1836.
- Walter, P., and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic-reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 77, 7112-7116.
- Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic-reticulum. 3. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal-membranes. *Journal of Cell Biology* 91, 557-561.
- Walter, P., and Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic-reticulum. *Nature* 299, 691-698.
- Walter, P., Ibrahim, I., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic-reticulum. 1. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *Journal of Cell Biology* 91, 545-550.
- Wang, B., Heath-Engel, H., Zhang, D.L., Nguyen, N., Thomas, D.Y., Hanrahan, J.W., and Shore, G.C. (2008). BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTR Delta F508 via the Derlin-1 complex. *Cell* 133, 1080-1092.
- Wanker, E.E., Sun, Y., Savitz, A.J., and Meyer, D.I. (1995). Functional-characterization of the 180-kD ribosome receptor in-vivo. *Journal of Cell Biology* 130, 29-39.
- Watson, M.L. (1955). The nuclear envelope - its structure and relation to cytoplasmic membranes. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1, 257-&.
- Welch, W.J., and Suhan, J.P. (1985). Morphological-study of the mammalian stress response - characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin-filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *Journal of Cell Biology* 101, 1198-1211.
- Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1996). The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* - Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 18181-18187.
- Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Green, S.R., and Kaufman, R.J. (1998). Protein serine/threonine phosphatase Ptc2p negatively regulates the unfolded-protein response by dephosphorylating Ire1p kinase. *Molecular and Cellular Biology* 18, 1967-1977.
- Welihinda, A.K., Tirasophon, W., and Kaufman, R.J. (2000). The transcriptional co-activator ADA5 is required for HAC1 mRNA processing in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 3377-3381.
- Werstuck, G.H., Lentz, S.R., Dayal, S., Hossain, G.S., Sood, S.K., Shi, Y.Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S.K., Malinow, M.R., *et al.* (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *Journal of Clinical Investigation* 107, 1263-1273.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., and Voeltz, G.K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *Journal of Cell Biology* 193, 333-346.
- Wiederkehr, A., Du, Y.R., Pypaert, M., Ferro-Novick, S., and Novick, P. (2003). Sec3p is needed for the spatial regulation of secretion and for the inheritance of the cortical endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4770-4782.
- Yang, W., and Paschen, W. (2009). The endoplasmic reticulum and neurological diseases. *Experimental Neurology* 219, 376-381.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Zhang, Q.P., Skepper, J.N., Yang, F.T., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *Journal of Cell Science* 114, 4485-4498.
- Zhen, Y.Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A., and Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 115, 3207-3222.